

Казанский Федеральный  
УНИВЕРСИТЕТ  
ИНСТИТУТ  
фундаментальной  
медицины и биологии

# **«Биохимия – основа наук о Жизни»**

*Материалы 2-ой Всероссийской  
школы-конференции молодых ученых*

**Казань, 7 - 9 ноября 2019 г.**

**КАЗАНЬ  
2019**

УДК 577.1

ББК 28.072

Б63

**Научный редактор:** доктор биологических наук, профессор **З.И. Абрамова;**

**Ответственный редактор:** кандидат биологических наук, доцент **Н.И. Акберова**

**Редакционная коллегия:**

кандидат биологических наук, доцент **О.А.Кравцова;**

кандидат биологических наук, доцент **Д.А. Темников;**

старший преподаватель **Е.Д.Изотова**

**Б63 Биохимия – основа наук о жизни** [Электронный ресурс]: материалы 2-ой Всероссийской школы-конференции молодых ученых (Казань, 7-9 ноября 2019 г.)/ под ред.З.И.Абрамовой, Н.И.Акберовой. - Электрон.текстовые данные (1 файл: 20,25 МБ). – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2019. – 178 с. – Систем. требования: Adobe Acrobat Reader. –Загл. с титул. экрана

В сборнике представлены материалы 2-ой Всероссийской школы-конференции молодых ученых «Биохимия – основа наук о Жизни», посвященной памяти профессора В.Г.Винтера, заложившего основные биохимические, молекулярно-генетические и фармакологические направления научных исследований, которые успешно развиваются сотрудниками кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии КФУ и ее выпускниками во многих российских и зарубежных университетах и институтах. Основная цель школы-конференции состояла в подготовке молодых ученых к работе по прорывным направлениям в биохимии и молекулярной биологии, знакомство с методами и подходами, используемых для проведения экспериментальных работ международного уровня.

Материалы рекомендованы научным работникам, преподавателям, докторантам, аспирантам, магистрантам и студентам для использования в научно-исследовательской, учебно-методической и практической работе

© Казанский университет, 2019

**Заслуженному работнику Высшей школы  
Республики Татарстан**



*Профессору  
Винтеру Виктору Георгиевичу  
посвящается*

## СОДЕРЖАНИЕ

Программа конференции	5
Доклады молодых ученых	12
Секция Молекулярные механизмы программируемой клеточной гибели	13
Секция Ферменты нуклеинового обмена	30
Секция Молекулярные основы медицинской биохимии	38
Секция Биохимия и молекулярная биология канцерогенеза	84
Секция Молекулярные механизмы наследственных заболеваний	112
Секция Математическая биология и биоинформатика	118
Секция Биотехнология и бионанотехнология	130
Эссе на тему «Биохимия – основа наук о жизни»	173

## Программа конференции

7 НОЯБРЯ, ЧЕТВЕРГ

**8.00-10.00 - Регистрация участников**

холл учебного здания ИФМиБ КФУ

ул. К. Маркса, 74

**10.00 – Открытие школы-конференции**

Актовый зал, ул. К. Маркса, 74

Приветственное слово проректора по биомедицинскому направлению КФУ, директора Института фундаментальной медицины и биологии КФУ, д.м.н., профессора **Киясова А.П.**

### Пленарные лекции

**10.10 - 10.20 Казанская школа биохимиков: прошлое и настоящее**

*Мустафин Ильшат Ганиевич, д.м.н., профессор, проректор по научной деятельности, заведующий кафедрой биохимии и КДЛ (Казанский государственный медицинский университет, г. Казань)*

**10.20 - 10.35 Биохимия в Казанском университете**

*Алимова Фариды Кашифовна, д.б.н., профессор, Школа наук о жизни и окружающей среде (Сиднейский университет, г. Сидней, Австралия)*

**10.35-10.55 МикроРНК (miRNA): открытие, образование, функционирование и многое другое**

*Офицеров Евгений Николаевич, д.х.н., профессор кафедры химии и технологии биомедицинских препаратов (Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, г. Москва)*

**10.55 - 11.10 Смотрел только вперед...**

*Фассахов Рустэм Салахович, д.м.н., профессор кафедры фундаментальных основ клинической медицины ИФМиБ (Казанский федеральный университет, г. Казань)*

**11.10 - 11.25 CAGE метод анализ РНК для исследований регуляторных участков генома в кардиологии**

*Гусев Олег Александрович, PhD, в.н.с., НИЛ Экстремальная биология, ИФМиБ (Казанский федеральный университет, г. Казань)*

11.25 - 11.40 – Кофе-брейк

**11.40 - 11.55 Противоопухолевые эффекты рибонуклеаз**

*Ильинская Ольга Николаевна, д.б.н., профессор, академик АН РТ, заведующая кафедрой микробиологии ИФМиБ (Казанский федеральный университет, г. Казань)*

**11.55 - 12.15 Тонкие пленки и модные клетки**

*Фахруллин Равиль Фаридович, д.б.н., г.н.с. НИЛ «Бионанотехнологии», ИФМиБ (Казанский федеральный университет, г. Казань)*

**12.15 - 12.35 Кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии на сегодняшний день и перспективы ее развития**

*Киямова Рамзия Галлямовна, д.б.н., заведующая кафедрой биохимии, биотехнологии и фармакологии ИФМиБ (Казанский федеральный университет, г. Казань)*

**12.35 - 13.00 Подведение итогов творческого конкурса за лучшее эссе на тему «Биохимия – основа наук о Жизни».**

**Вручение именной стипендии имени В.Г. Винтера победителю конкурса**

13.00-14.00 – Перерыв на обед

**14.00 - 14.20 Биохимические школы Военной медицинской академии: история и современность**

*Иванов Андрей Михайлович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики (Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург)*

**14.20 - 14.40 О содружестве биохимиков КГУ и ветеринарной медицины**

*Алимов Азат Миргасимович, д.в.н., профессор, кафедра неорганической и биологической химии (Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана, г. Казань)*

**14.40 - 15.00 История создания производственной лаборатории на базе лаборатории БНК**

*Хаертынов Камиль Саубанович, к.б.н., с.н.с, заведующий Центральной научно-исследовательской лаборатории (Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО, г. Казань)*

15.00 - 15.15 – Кофе-брейк

**15.15 - 15.35 Структурно-функциональный анализ факторов регуляции трансляции *Staphylococcus aureus***

*Юсупов Марат Миратович, к.б.н., в.н.с., НИЛ Структурная биология ИФМиБ (Казанский федеральный университет), директор исследователь Института генетики и молекулярной биологии клетки, заведующий отделом Интегративной структурной биологии, лауреат премии Аминова Шведской Королевской Академии наук (г. Страсбург, Франция)*

**15.35 - 15.55 Молекулярные основы аутоиммунных заболеваний: успехи, методы и модели на примере системной красной волчанки**

*Козырев Сергей Владимирович, PhD, доцент, Уппсальский университет (г. Уппсала, Швеция)*

**15.55 - 16.15 Вклад клеточной гибели в развитие аутоиммунных и онкологических заболеваний**

*Абрамова Зинаида Ивановна, д.б.н., профессор, кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии ИФМиБ КФУ (Казанский федеральный университет, г. Казань)*

**16.30 – 18.00 Постерная сессия**

**8 НОЯБРЯ, ПЯТНИЦА**

**МАСТЕР-КЛАССЫ**

**10.00-13.00**

- ❖ **Принцип и основные области применения цифровой капельной ПЦР (ddPCR). Преимущества перед ПЦР в режиме реального времени. Обсуждение основных этапов дизайна, постановки и анализа результатов эксперимента.**

*Преподаватель Вернер А.Э., специалист по продукции компании «Био-Рад»*

*Место проведения: ул. Кремлевская, д.18, Восточное крыло, ауд. 115В*

- ❖ **Культура клеток растений: получение, поддержание и практическое применение**

*Преподаватель: Акулов А.Н., к.б.н., ст. научный сотрудник Лаборатории Биологии клеток in vitro, Казанский институт биохимии и биофизики, обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН*

*Место проведения: ул. Кремлевская, д.18, Восточное крыло, ауд. 07В*

- ❖ **Очистка рекомбинантного зеленого флуоресцентного белка**

*Преподаватель: Хайруллин Р.Ф., к.х.н., с.н.с., НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии, ИФМиБ, КФУ*

*Место проведения: ул. Парижской Коммуны д.9, ауд. 507*

- ❖ **Лекарственные формы на основе амфифильных полимеров и пептидов**

*Преподаватель: Абдуллин Т.И., к.б.н., доцент, кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии ИФМиБ КФУ*

*Место проведения: ул. Парижской Коммуны д.9, ауд. 223*

- ❖ **Прокариотические нуклеазы**

*Преподаватель Ульянова В.В., к.б.н., ст. научный сотрудник НИЛ OpenLab Маркеры патогенеза ИФМиБ КФУ*

*Место проведения: ул. Кремлевская, д.18, Восточное крыло, ауд. 309В*

- ❖ **Моделирование структуры и динамики биологических макромолекул**

*Преподаватель: Акберова Н. И., к.б.н., доцент, кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии ИФМиБ КФУ*

*Место проведения: ул. Кремлевская, д.18, Восточное крыло, ауд. 116В*

13.00-14.00 – Перерыв на обед



**14.00-17.00**

❖ **Программируемая клеточная гибель: Роль в развитии онкологических и аутоиммунных заболеваний**

*Преподаватель: Абрамова З.И., д.б.н., профессор, кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии ИФМиБ КФУ*

*Место проведения: ул. Кремлевская, д.18, Восточное крыло, ауд. 104В*

❖ **Основы молекулярно-генетического анализа**

*Преподаватель Кравцова О.А., к.б.н., доцент, кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии ИФМиБ КФУ*

*Место проведения: ул. Кремлевская, д.18, Восточное крыло, ауд. 115В*

❖ **Изучение биологически активных соединений на примере лектинов микромицетов**

*Преподаватель Багаева Т.В., д.б.н., профессор, кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии ИФМиБ КФУ*

*Место проведения: ул. Кремлевская, д.18, Восточное крыло, ауд. 08В*

❖ **Факторы гибернации рибосом. Выделение и функциональный анализ**

*Преподаватель Валидов Ш. З, PhD, с.н.с. НИЛ «Структурная биология», ИФМиБ КФУ*

*Место проведения: ул. Парижской Коммуны д.9, ауд. 208*

❖ **Разработка противоопухолевых препаратов с применением современных методов исследований**

*Преподаватель: Булатов Э. Р., Ph.D., в.н.с., НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии, группа Химической Биологии, ИФМиБ КФУ*

*Место проведения: ул. Парижской Коммуны д.9, ауд. 512*

## 9 НОЯБРЯ, СУББОТА

АКТОВЫЙ ЗАЛ

ул. К. Маркса, 76

### 10.00 – 12.00 Устные доклады молодых ученых

#### **10.00 - 10.15 Секция 1. Молекулярные механизмы программируемой клеточной гибели**

ИНДУКЦИЯ АПОПТОЗА КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ  
ПРОИЗВОДНЫХ ФОСФОНИЕВЫХ СОЛЕЙ

*А.П. Любина, А.С.Сапунова, С.К.Гумерова, А.Д.Волошина, Д.А.Татаринов,  
Н.В.Терехова, В.Ф.Мионов*

ФГБУН Институт Органической и Физической Химии Им. А. Е. Арбузова КазНЦ РАН

#### **10.15 - 10.30 Секция 2. Ферменты нуклеинового обмена ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПЕПТИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ – БИНАЗЫ**

*Дудкина Е.В., Сурченко Ю.В., Ульянова В.В*

ИФМиБ, Казанский федеральный университет

#### **10.30 - 10.45 Секция 3. Молекулярные основы медицинской биохимии ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЕЙ АНТИТЕЛ К ДЦДНК И Р-СЕЛЕКТИНА В КРОВИ БОЛЬНЫХ СИСТЕМОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ**

*И. А. Андрианова, А. И. Хабирова, Р. И. Литвинов*

НИЛ «Белково-клеточные взаимодействия»

ИФМиБ, Казанский федеральный университет

#### **10.45 – 11.00 Секция 4. Биохимия и молекулярная биология канцерогенеза**

РОЛЬ БЕЛКА NEDD9 В РЕГУЛЯЦИИ РЕПАРАЦИИ ДНК ПРИ  
ПРОГРЕССИРОВАНИИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО (НМРЛ)

*Тихомирова М.В., Абрамова З.И., Денека А.Я.*

ИФМиБ, Казанский федеральный университет

#### **11.00 – 11.15 Секция 5. Молекулярные механизмы наследственных заболеваний**

ТРАНСПОРТ  $Ca^{2+}$  В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА В УСЛОВИЯХ МЫШЕЧНОЙ  
ДИСТРОФИИ ДЮШЕННА

*Дубинин М.В., Таланов Е.Ю., Старинец В.С., Теньков К.С., Белослудцев К.Н.*

ФГБОУ ВО Марийский государственный университет

#### **11.15 – 11.30 Секция 6. Биоинформатика**

ПОДГОТОВКА ДАННЫХ ДЛЯ СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА СПЕКТРА  
МУТАЦИЙ В ГЕНАХ СЕМЕЙСТВА RAS ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

*Коньшева Д.Н.*

ИФМиБ, Казанский федеральный университет

**11.30 – 11.45 Секция 7. Биотехнология и бионанотехнология**  
**БИОДЕГРАДАЦИЯ И ТОКСИЧНОСТЬ БЕЛОГО ФОСФОРА**

*Акосах Й.Ф.*<sup>1\*</sup>, *Миндубаев А.З.*<sup>2</sup>, *Бабынин Э.В.*<sup>1</sup>, *Бадеева Е.К.*<sup>2</sup>, *Минзанова С.Т.*<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Казанский федеральный университет

<sup>2</sup> Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН

**12.00 –Подведение итогов конференции.**

**Вручение дипломов за лучший устный и стендовый доклад**

**Заккрытие конференции**

*заместитель директора по научной деятельности ИФМиБ КФУ*

*к.м.н., Файзуллин Р.И.,*

ДОКЛАДЫ  
МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

## СЕКЦИЯ «МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ»

### АПОПТОЗИНДУЦИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ТРИФТОРМЕТАНСУЛЬФОНАТА (1,4-ДИГИДРОКСИНАФТ-2-ИЛ)ТРИФЕНИЛАРСОНИЯ

*С.К. Гумерова, Н.Р. Хасиятуллина, А.Д. Волошина, А.С. Сапунова, В.Ф. Миронов*

ФГБУН Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова КазНЦ РАН,

Казань, Россия.

[symbelya07@mail.ru](mailto:symbelya07@mail.ru), 89196241422

**Введение.** Фосфониевые соли привлекают большое внимание исследователей в области химиотерапии благодаря проявлению ими антимикробных, антиоксидантных и противоопухолевых свойств. К основному механизму действия противоопухолевых соединений относится индукция апоптоза. Мы предположили, что арсониевые соли могут проявлять аналогичные виды активности. В связи с этим целью настоящей работы явилась оценка апоптозиндуцирующей активности трифторметансульфоната (1,4-дигидроксинафт-2-ил)трифениларсония, который показал селективную цитотоксическую активность в отношении аденокарциномы двенадцатиперстной кишки HuTu 80.

**Материалы и методы.** В работе были исследованы четыре представителя арсониевых солей на основе орто- и пара-хинонов. В ходе работы мы определяли антимикробную [1] и гемолитическую активность [1] образцов стандартными методами, также оценивали цитотоксическую активность соединений на нормальных и опухолевых линиях клеток человека используя приложение Cell Viability BioApp, которое позволяет точно подсчитать количество клеток, оценить их жизнеспособность на основании интенсивности флуоресценции [1]. Затем мы изучали индукцию апоптоза на примере соединения-лидера трифторметансульфоната (1,4-дигидроксинафт-2-ил) трифениларсония с помощью многофункциональной системы Cytell Cell Imaging с использованием флуоресцентных красителей аннексина V-Alexa Fluor 647, DAPI и пропидия йодида. Апоптозиндуцирующую активность фосфониевой соли Shin 7 оценивали также с помощью проточного цитометра Guava easy Cyte (MERCCK, USA) с использованием флуоресцентных красителей аннексина V-Alexa Fluor 647 и пропидия йодида.

**Результаты.** Данные структуры проявили селективную антимикробную активность в отношении грамположительных бактерий и обладали низкой гемолитическим действием. Наиболее эффективными оказались соединения трифторметилсульфонаты (6-бром-1,2-дигидроксинафт-4-ил)трифениларсония (Shin-4); (1,4-дигидроксинафт-2-ил)трифениларсония (Shin-7); (2,5-дигидроксифенил)трифениларсония (Shin-8). МИК этих соединений проявляется на уровне коммерческого препарата хлорамфеникола. Также исследуемые соединения показали высокую цитотоксическую активность в отношении опухолевых линий и демонстрировали умеренную цитотоксичность в отношении здоровых линий клеток. В дальнейшем мы исследовали индукцию апоптоза на клеточной линии аденокарциномы двенадцатиперстной кишки (HuTu 80) под воздействием соединения-

лидера Shin-7. Исходя из полученных результатов можно утверждать, что (1,4-дигидроксиафт-2-ил)трифениларсония (Shin-7) обладает дозозависимой апоптозиндуцирующей активностью. С увеличением концентрации вещества можно наблюдать появление клеток на стадиях раннего и позднего апоптоза.

**Обсуждение.** Исследуемые соединения оказались менее токсичными в отношении нормальных линий клеток, что является хорошим показателем при разработке новых противоопухолевых препаратов. На опухолевых линиях M-Hela и MCF<sub>7</sub> исследованные арсониевые соли оказались цитотоксически неактивными. В дальнейшем, мы изучали индукцию апоптоза, на примере соединения-лидера Shin 7 в отношении опухолевой линии HuTu 80 с использованием многофункциональной системы Cytell Cell Imaging и проточной цитометрии. Как видно из полученных результатов, арсониевая соль Shin 7 обладает дозозависимой апоптозиндуцирующей активностью, что было зафиксировано в обоих методах. Активность исследуемого соединения в основном проявлялась на стадии раннего апоптоза и усиливалась с возрастанием концентрации.

**Заключение.** Исследуемая тетраарилфосфониевая соль Shin 7 проявляла селективную цитотоксическую активность в отношении аденокарциномы двенадцатиперстной кишки HuTu 80, механизм действия которой вероятнее всего заключается в индукции в основном ранней стадии апоптоза.

#### *Список литературы*

1. R.R. Sharipova, M.G. Belenok, B.F. Garifullin, A.S. Sapunova, A.D. Voloshina, O.V. Andreeva, I.Yu. Strobrykina, P.V. Skvortsova, Yu.F. Zuev, V.E. Kataev Synthesis and anti-cancer activities of glycosides and glycoconjugates of diterpenoid isosteviol. 2019. 10: 1488–1498.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 18-33-00224.*

### **ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ АПОПТОЗА ДИКАТИОННЫХ ПАВ, СОДЕРЖАЩИХ ИМИДАЗОЛИЕВЫЙ ФРАГМЕНТ**

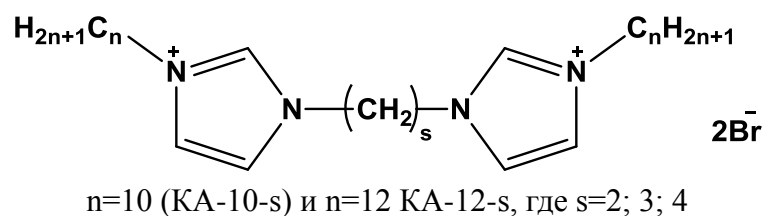
*С.К. Гумерова, А.Д. Волошина., А.С. Сапунова, А.Б. Миргородская, А.А. Котенко, Т.М. Прокопьева, В.А. Михайлов.*

ФГБУН Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова КазНЦ РАН, Казань, Россия.

[symbelya07@mail.ru](mailto:symbelya07@mail.ru), 89196241422

**Введение.** Поверхностно-активные вещества (ПАВ), содержащие имидазолиевый фрагмент в структуре молекулы, привлекают большое внимание исследователей в области химиотерапии, так как зачастую эти соединения проявляют высокую антимикробную активность, обладают низкими цитотоксическими свойствами в отношении здоровых клеток и способны к относительно быстрой биодegradации, что способствует снижению загрязнения окружающей среды [1]. Однако мало известно о противоопухолевых свойствах дикатионных ПАВ и о механизмах действия данной активности. В связи с этим целью настоящей работы явилась оценка противоопухолевой и апоптозиндуцирующей активности дикатионных ПАВ, содержащих имидазолиевый фрагмент.

**Материалы и методы.** Объектами исследований являлись дикатионные алкилимидазолиевые ПАВ. В полученных соединениях отличались длиной гидрофобного радикала и расстоянием между головными группами.



Данные дикатионные ПАВ ранее показали высокую антимикробную активность в отношении широкого спектра тест-микроорганизмов и проявили низкую токсичность по отношению к клеткам крови человека. В отношении грамположительных бактерий некоторые из них проявляли бактерицидную активность на уровне фторхинолонового антибиотика ципрофлоксацина. В настоящей работе была исследована цитотоксичность соединений в отношении условно-нормальных и опухолевых клеточных линий человека. Для изучения индукции апоптоза на примере соединения-лидера была проведена методом проточной цитометрии с помощью системы Guava easy Cyte (MERCK, USA) с использованием флуоресцентных красителей аннексина V-Alexa Fluor 647 и пропидия йодида [2]. Далее с целью определения возможности протекания апоптоза по митохондриальному пути, была проведена проточная цитометрия с применением флуоресцентного красителя JC-10 (в наборе Mitochondria Membrane Potential Kit) [2].

**Результаты.** Дикатионные имидазолиевые ПАВ были исследованы на цитотоксичность в отношении нормальных и опухолевых клеточных линий человека. Они показали высокую цитотоксическую активность против опухолевых линий и демонстрировали умеренную цитотоксичность в отношении здоровых клеток. В дальнейшем исследовали индукцию апоптоза на клеточных линиях карциномы шейки матки (M-Hela) под воздействием соединения-лидера РК-11 КА 10-4. Исходя из полученных результатов можно утверждать, что дикатионный ПАВ РК-11 КА 10-4 обладает дозозависимой апоптозиндуцирующей активностью и снижает мембранный потенциал митохондрий.

**Обсуждение.** В основном, исследуемые соединения оказались менее токсичными в отношении нормальных клеточных линий, что является хорошим показателем при разработке новых противоопухолевых препаратов. К тому же исследуемые соединения проявили избирательную токсичность в отношении клеточной линии аденокарциномы двенадцатиперстной кишки (HuTu 80) и линии клеток карциномы шейки матки (M-Hela).

По данным, полученным методом проточной цитометрии видно, что в результате 24 часовой инкубации клеток M-Hela в присутствии дикатионного ПАВ РК-11 КА 10-4, наблюдается дозозависимая индукция процесса апоптоза. При повышении концентрации вещества наблюдалось увеличение числа клеток в стадии позднего апоптоза.

Было выявлено снижение мембранного потенциала митохондрий клеток M-Hela, при обработке соединением РК-11 КА 10-4, возрастающее с увеличением концентрации. Известно, что снижение мембранного потенциала митохондрий наблюдается в процессе программируемой клеточной гибели, в частности в процессе апоптоза, протекающего по митохондриальному пути.

**Заключение.** Исследуемый дикатионный ПАВ РК-11 КА 10-4, проявляет селективную цитотоксическую активность в отношении клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки HuTu 80, механизм активности которого вероятнее всего заключается в индукции апоптоза, протекающего по митохондриальному пути.

*Список литературы*

1. M. T. Garcia, I. Ribosa, L. Perez, A. Manresa, F. Comelles. Aggregation behavior and antimicrobial activity of ester-functionalized imidazolium- and pyridinium- based ionic liquids in aqueous solution. 2017. *Langmuir*. 33: 6511-6520.

2. R. R. Sharipova, M. G. Belenok, B. F. Garifullin, A. S. Sapunova, A. D. Voloshina, O. V. Andreeva, I. Yu. Strobykina, P. V. Skvortsova, Yu. F. Zuev, V. E. Kataev. Synthesis and anti-cancer activities of glycosides and glycoconjugates of diterpenoid isosteviol. *Med Chem Comm*. 2019. 10: 1488–1498.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ № 19-73-30012*

## ИНДУКЦИЯ АПОПТОЗА КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФОСФОНИЕВЫХ СОЛЕЙ

*А.П.Любина, А.С.Сапунова, С.К.Гумерова, А.Д.Волошина, Д.А.Татаринов, Н.В.Терехова, В.Ф.Миронов.*

ФГБУН Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова КазНЦ РАН,

Казань, Россия.

[aplyubina@gmail.com](mailto:aplyubina@gmail.com), 89867190201

**Введение.** Фосфониевые соли представляют собой широко изученный класс фосфорорганических соединений. В медицине они могут применяться в качестве противомикробных, противоопухолевых и других агентов. Известна способность фосфониевых солей целенаправленно проникать через мембрану митохондрий и накапливаться в них, нарушая деятельность этих органелл [1]. Митохондрии играют ключевую роль в процессе программируемой клеточной гибели. Также известно, что в опухолевых клетках наблюдается повышенный митохондриальный трансмембранный потенциал ( $\Delta\psi_m$ ) [2]. Основываясь на этих данных, был синтезирован ряд производных фосфониевых солей, предположительно влияющих на митохондрии опухолевых клеток.

**Материалы и методы.** В работе был исследован ряд дифенилалкил-2- (2-гидроксифенил) этенилфосфониевых солей. Соединения в ряду отличаются длиной алкильных радикалов при атоме фосфора. Данные структуры ранее показали избирательную антимикробную активность в отношении грамположительных бактерий [3]. В работе была исследована цитотоксичность соединений в отношении условно-нормальных и опухолевых клеточных линий человека с использованием протокола Cell Viability BioApp системы визуализации клеток Cytell Cell Imaging (GE Healthcare Life Science, Швеция). Далее для изучения индукции апоптоза, на примере соединения-лидера были проведены цитометрические исследования с использованием набора Annexin V-Cy3™ Apoptosis Detection Kit (Sigma-Aldrich, USA), лазерная конфокальная микроскопия с применением флуоресцентного красителя JC-10 (в наборе Mitochondria Membrane Potential Kit) и оценка апоптотических эффектов с использованием набора сигналов раннего апоптоза MILLIPLEX® MAP 7-plex, семи маркеров раннего апоптоза JNK, Bad, Bcl-2, Akt, Caspase-9 p53 и Caspase. -8 (измерения проводили при помощи системы Luminex®).



**Результаты.** В целом, данные фосфониевые соли проявляют низкую избирательность по отношению к опухолевым клеточным линиям. Однако нами было выявлено соединение-лидер, содержащее октильный радикал при атоме фосфора, концентрация полумаксимального ингибирования которого в отношении нормальных гепатоцитов человека (клеточная линия Chang liver) в два раза больше этого же показателя для клеток карциномы печени человека (клеточная линия Hep G2).

По данным, полученным в результате проточной цитометрии видно, что в результате 24 часовой инкубации клеток M-Nela в присутствии соединения-лидера наблюдается процесс апоптоза. С увеличением концентрации вещества можно наблюдать появление клеток в процессе позднего апоптоза.

Проведение конфокальной микроскопии позволило оценить изменение мембранного потенциала митохондрий. Было выявлено снижение мембранного потенциала митохондрий клеток M-Nela и WI-38 VA 13 subline 2RA, при обработке исследуемым соединением. Как известно, снижение мембранного потенциала митохондрий наблюдается в процессе программируемой клеточной гибели.

Детекция маркеров раннего апоптоза при помощи системы Luminex® выявила увеличение флуоресценции каспазы-9, белков bcl-2 и Akt, JNK и незначительное снижение флуоресценции Bad. Уровень каспазы-8 в опытных и контрольных образцах оставался неизменным.

**Обсуждение.** Результаты, полученные методом проточной цитометрии и лазерной конфокальной микроскопии, позволили доказать индукцию апоптоза в результате воздействия исследуемых соединений, а также продемонстрировать нацеливание данных соединений на митохондрии.

Увеличение каспазы-9 в результате обработки фосфониевыми солями говорит об индукции апоптоза по внутреннему, митохондриальному пути. Внешний путь программируемой клеточной гибели не был выявлен в результате взаимодействия соединения с клетками. Это подтверждается преобладанием антиапоптотических белков Bcl-2, которые регулируют гибель клеток путем контроля проницаемости митохондриальной мембраны. Причиной апоптоза может являться стресс, который испытывает клетка. Об этом говорит увеличение белка JNK, известного как C-Jun N-концевая киназа или стресс-активированная протеинкиназа.

**Заключение.** Исходя из полученных данных, можно заключить, что исследуемые производные фосфониевых солей обладают цитотоксическим действием, обусловленным индукцией апоптоза, протекающего по митохондриальному пути.

#### *Список литературы*

1. A. G. Cairns, S. J. McQuaker, M. P. Murphy, R. C. Hartley. Targeting mitochondria with small molecules: the preparation of MitoB and MitoP as exomarkers of mitochondrial hydrogen peroxide. Humana Press, New York, 2015 pp. 25-50.
2. J. A. Jara, V. Castro-Castillo, J. Saavedra-Olavarría, L. Peredo, M. Pavanni, F. Jaña, M. E. Letelier, E. Parra, M. I. Becker, A. Morello, U. Kemmerling. Antiproliferative and uncoupling effects of delocalized, lipophilic, cationic gallic acid derivatives on cancer cell lines. Validation in vivo in syngenic mice. Journal of medicinal chemistry. 2014; 57: 2440-2454.
3. Д.А. Татаринов, Н.В. Терехова, А.Д. Волошина, А.С. Сапунова А.С., А.П. Любина, В.Ф. Миронов. Синтез и антимикробная активность новых диалкил(диарил)-2- (2-гидрокси-5-хлорфенил-2-фенилэтинил) пентилфосфониевых солей. Журнал общей химии. 2018; 88: 1-7

*Работа частично выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект No 14-50-00014).*

*Исследование апоптоза методом лазерной конфокальной микроскопии проводили совместно с междисциплинарным центром «Аналитическая микроскопия».*

*Оценку апоптотических эффектов с использованием набора сигналов раннего апоптоза MILLIPLEX® MAP 7-plex проводили совместно с лабораторией химико-биологических исследований института органической и физической химии им. А. Е. Арбузова КазНЦ РАН*

## **СТИМУЛЯЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ ИММУННЫМИ КОМПЛЕКСАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ФАКТОР 4, ВЫЗЫВАЕТ АКТИВАЦИЮ КАЛЬПАИНА**

*Мордаханова Э.Р., Невзорова Т.А., Пешкова А.Д., Литвинов Р.И.*

НИИ «Белково-клеточные взаимодействия», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

[elmira.m.m@yandex.ru](mailto:elmira.m.m@yandex.ru) , +79520331064

**Введение.** Гепарин-индуцированная тромбоцитопения (ГИТ) – осложнение, вызываемое применением гепарина, характеризующееся уменьшением числа тромбоцитов в крови и риском развития тромбозов. Заболевание опосредовано антителами к комплексу тромбоцитарный фактор 4(ТФ4)/гепарин, однако клеточные механизмы ГИТ остаются малоизученными. Мы исследовали прямое влияние патогенных (ККО/ТФ4) и непатогенных (РТО/ТФ4) иммунных комплексов, содержащих ТФ4, на тромбоциты.

**Материалы и методы.** Изолированные тромбоциты человека инкубировали с иммунными комплексами, содержащими патогенные (ККО) и непатогенные (РТО) мышинные моноклональные антитела и ТФ4. Анализировали активность протеаз кальпаина и каспазы-3 методами проточной цитометрии и флюоресцентной спектрофотометрии, а также содержание в лизатах тромбоцитов про-каспазы-3 и антиапоптотического белка Bcl-X<sub>L</sub> - методом вестерн-блоттинга. Тромбоциты, инкубированные с кальциевым ионофором A23187, использовали в качестве положительного контроля.

**Результаты.** Методом проточной цитометрии не было выявлено изменений активности каспазы-3 в клетках под действием комплексов ККО/ТФ4 или РТО/ТФ4. Однако вестерн-блот показал слабовыраженное расщепление про-каспазы-3; кроме того, наблюдалась тенденция к уменьшению экспрессии белка Bcl-X<sub>L</sub> на 60-й минуте инкубации при обработке тромбоцитов патогенными иммунными комплексами. Оказалось, что комплексы ККО/ТФ4 индуцируют активацию кальпаина в тромбоцитах с пиком к 180 мин инкубации. Эффект изолированных ККО и ТФ4 был сопоставим с негативным контролем, т. е. необработанными тромбоцитами. Кальциевый ионофор A23187 (положительный контроль) вызывал сильную активацию кальпаина, полное расщепление про-каспазы-3 и подавление экспрессии Bcl-X<sub>L</sub>.

**Заключение.** Нами обнаружено расщепление про-каспазы-3 и угнетение экспрессии антиапоптотического белка Bcl-X<sub>L</sub>, а также достоверное увеличение активности кальпаина в тромбоцитах под действием патогенных иммунных комплексов, содержащих ТФ4. Эти данные свидетельствуют о том, что под действием патогенных иммунных комплексов в

тромбоцитах после активации наблюдаются признаки клеточной гибели, преимущественно по кальпаин-зависимому пути. Именно гибель тромбоцитов под действием иммунных комплексов является возможной причиной тромбоцитопении при ГИТ.

*Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности КФУ и гранта 18-415-160004 РФФИ и РТ.*

## **ПОИСК РЕГУЛЯТОРОВ АПОПТОЗА В РЯДУ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ УРАЦИЛА, СОДЕРЖАЩИХ 1,2,3- И 1,2,4-ТРИАЗОЛИЕВЫЕ ФРАГМЕНТЫ**

*А.С.Сапунова, Н.В.Кулик, А.Д.Волошина, А.П. Любина, С.К. Гумерова, Е.С.Крылова, В.Э.Семенов.*

ФГБУН Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова КазНЦ РАН, Казань, Россия.

[anastasiastrobykina@yandex.ru](mailto:anastasiastrobykina@yandex.ru), 89656091760

**Введение.** Поиск регуляторов апоптоза имеет большие шансы на успех в тех фармакологических группах, представители которых обладают широким спектром биологических эффектов в различных тест-системах. Ксимедон, синтезированный в ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, является одним из наиболее простых негликозидных пиримидин-нуклеозидов, который способен регулировать молекулярные механизмы Bcl-2/Bag-1-зависимой программированной клеточной гибели. В связи с этим были предприняты попытки разработать молекулу, избирательно влияющую на раковые клетки, вызывая апоптоз, и не затрагивающую здоровые клетки. Основываясь на полученных данных были синтезированы 1,3-Бис(алкил)-6-метилурацилы, содержащие 1,2,3- и 1,2,4-триазолиевые фрагменты. Данные соединения обладают широким спектром антимикробной активности, противоопухолевым действием и проявляют умеренную токсичность в опытах на лабораторных животных [1].

**Материалы и методы.** Производные урацила были исследованы в отношении условно-нормальных и опухолевых клеточных линий человека. Оценку их цитотоксического действия проводили путем подсчета жизнеспособных клеток с помощью многофункциональной системы Cytell Cell Imaging, определяя IC<sub>50</sub>. Индукция апоптоза изучалась в системе проточной цитофлуориметрии Guava easy Cyte HT с использованием набора Annexin V-Cy3™ Apoptosis Detection Kit (Sigma-Aldrich, USA). При помощи системы Luminex® были изучены апоптотические эффекты (набор MILLIPLEX® MAP 7-plex содержащий семь маркеров раннего апоптоза, такие как JNK, Bad, Bcl-2, Akt, Caspase-9, p53 и Caspase-8) [2]. Применяя флуоресцентный краситель JC-10 (в наборе Mitochondria Membrane Potential Kit) проводилась проточная цитофлуориметрия.

**Результаты.** Исследованные производные урацила различаются по количеству метиленовых групп в соединительных мостиках, а также природой радикалов при заряженном атоме азота и 4 атоме углерода триазолового фрагмента. Для изучения механизма действия были отобраны соединения, избирательно действующие на опухолевые линии и не оказывающие сильного токсического эффекта на нормальные клеточные линии.

Используя флуоресцентную микроскопию, были выявлены вещества, проявляющие апоптотическое действие на клетки M-Hela. Проточная цитофлуориметрия показала, что соединения, имеющие в своем составе пентильный и октильный радикалы имеют сходное распределение популяций клеток в раннем и позднем апоптозе.

Расширенный анализ маркеров раннего апоптоза в системе LumineX позволил определить увеличение уровня каспазы-9, белков JNK и Akt и снижение уровня Bad. Исследованные соединения практически не влияли на уровень каспазы-8.

Используя краситель JC-10 было определено снижение мембранного потенциала митохондрий линии M-Hela под воздействием изученных соединений.

**Обсуждение.** Полученные данные указывают на то, что апоптоз протекает по внутреннему пути активации каспазы-9, в котором гибель клеток происходит из-за дисфункции митохондрий, а не по внешнему пути, связанному с активацией каспазы-8. Это предположение подтверждается также результатами экспериментов с JC10. Результаты показывают, что апоптоз в клетках M-Hela может быть индуцирован активацией транскрипции многих проапоптотических генов факторами транскрипции AP1 (сигнальный путь, активируемый стрессом JNK) и p53 (ответ на повреждение ДНК).

#### **Заключение.**

Исходя из полученных результатов можно утверждать, что механизм действия исследованных производных урацила связан с активацией апоптоза, протекающего по внутреннему пути.

#### *Список литературы*

1. A.D. Voloshina, V. E. Semenov, A. S. Strobukina, N. V. Kulik, E. S. Krylova, V. V. Zobov, V. S. Reznik Synthesis and antimicrobial and toxic properties of novel 1,3-bis(alkyl)-6-methyluracil derivatives containing 1,2,3- and 1,2,4-triazolium fragments. Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2017; 43: 170–176.

2. A. Smolobochkin, A. Gazizov, M. Sazykina, N. Akylbekov, E. Chugunova, I. Sazykin, A. Gildebrant, Ju. Voronina, A. Burilov, Sh. Karchava, M. Klimova, A. Voloshina, A. Sapunova, E. Klimanova, T. Sashenkova, U. Allayarova, A. Balakina, D. Mishchenko Synthesis of novel 2-(het)arylpyrrolidine derivatives and evaluation of their anticancer and anti-biofilm activity. Molecules. 2019; 24: 3086.

*Работа частично выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект No 14-50-00014).*

*Оценку апоптотических эффектов с использованием набора сигналов раннего апоптоза MILLIPLEX® MAP 7-plex проводили совместно с лабораторией химико-биологических исследований института органической и физической химии им. А. Е. Арбузова КазНЦ РАН*

### **ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ СТИМУЛЯЦИИ СВОБОДНОГО ДЫХАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ ПАЛЬМИТИНОВОЙ КИСЛОТОЙ И ПРОДУКТАМИ ЕЕ $\omega$ -ОКИСЛЕНИЯ**

Семенова А.А., Самарцев В.Н., Павлова С.И., Иванов Ан.Н., Дубинин М.В.

ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет»

sem\_al.ru@mail.ru тел.89278717390

**Введение.** В клетках животных основная доля АТФ образуется в митохондриях в процессе транспорта электронов по дыхательной цепи от субстратов окисления до

молекулярного кислорода и фосфорилирования ADP при участии  $F_0F_1$ -АТФ-синтазы, т.е. при окислительном фосфорилировании [1]. Сопряжение дыхания и окислительного синтеза АТФ не является полным – часть потребляемого митохондриями кислорода не связано с синтезом АТФ. Так в клетках печени млекопитающих до 30% потребления кислорода митохондриями не связано с синтезом АТФ [1]. В экспериментах на изолированных митохондриях такое дыхание, называемое также «свободным», обычно оценивали как скорость потребления кислорода в отсутствие синтеза АТФ.

Эффективными природными индукторами свободного дыхания рассматриваются свободные монокарбоновые жирные кислоты. В нормальных физиологических условиях основным путем метаболизма жирных кислот в клетках печени является их  $\beta$ -окисление в митохондриях и пероксисомах. Другой путь метаболизма жирных кислот –  $\omega$ -окисление, при физиологических условиях не превышает и 10% от их общего метаболизма и рассматривается как минорный метаболический путь. Так, в процессе  $\omega$ -окисления одной из наиболее распространенных жирных кислот – пальмитиновой, на первом этапе образуется  $\omega$ -гидроксипальмитиновая кислота (ГПК), на следующем этапе –  $\alpha,\omega$ -гексадекандикарбоновая кислота (ГДК). Путь  $\omega$ -окисления значительно усиливается под влиянием различных ксенобиотиков – индукторов ферментов гидроксилирования жирных кислот, при потреблении этанола, при некоторых состояниях, сопровождающихся увеличением содержания свободных монокарбоновых жирных кислот (ожирение, голодание, сахарный диабет, неалкогольная жировая болезнь печени и др.), а также при различных нарушениях их метаболизма.

**Материалы и методы.** Митохондрии из печени белых половозрелых крыс самцов (массой 210–250 г) выделяли методом дифференциального центрифугирования с последующим освобождением от эндогенных жирных кислот с помощью бычьего сывороточного альбумина [2]. Среда выделения содержала 250 мМ сахарозы, 1 мМ EGTA, 5 мМ MOPS-трис (pH 7,4) Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом при 25°C. Разность электрических потенциалов ( $\Delta\psi$ ) на внутренней мембране митохондрий оценивали по распределению катиона тетрафенилфосфония (ТФФ<sup>+</sup>) через внутреннюю мембрану, концентрацию которого регистрировали с помощью ТФФ<sup>+</sup>-чувствительного электрода. Набухание митохондрий регистрировали по изменению оптической плотности суспензии митохондрий при длине волны 540 нм. Среда инкубации содержала 200 мМ сахарозы, 20 мМ KCl, 5 мМ янтарной кислоты, 0,5 мМ EGTA, 10 мМ MOPS-трис (pH 7,4). Перечень применяемого оборудования и используемых материалов приведен в наших предыдущих работах [3].

**Результаты и их обсуждение.** В ходе эксперимента было выявлено, что пальмитиновая кислота (ПК), ГПК и ГДК в концентрации 30, 30 и 100 мкМ соответственно стимулируют дыхание митохондрий печени приблизительно в равной степени. Добавление после ПК последовательно 1 мкМ карбоксиатрактилата, 2 мМ глутамата и 10 мкМ циклоспорина А приводит к полному ингибированию дыхания, что подтверждает полученные ранее данные [2, 4]. В отличие от этого, карбоксиатрактилат, глутамат и циклоспорин А в указанных концентрациях не влияют на стимулированное ГПК и ГДК дыхание. В следующих экспериментах циклоспорин А в концентрации 10 мкМ добавлен к митохондриям за 2 мин до ГДК и ГПК. В этих условиях циклоспорин А устраняет способность ГДК стимулировать дыхание митохондрий вплоть до ее концентрации 60 мкМ, но не влияет на стимуляцию дыхания митохондрий ГПК. ГДК в отличие от ГПК и ПК,

увеличивая скорость дыхания митохондрий, в меньшей степени вызывает снижение  $\Delta\psi$ . Ранее уже предполагалось, что способность одной из длинноцепочечных  $\alpha,\omega$ -дикарбоновых кислот –  $\alpha,\omega$ -тетрадекандикарбоновой так же, как некоторых других так называемых «десопрягающих» агентов стимулировать дыхание митохондрий без снижения  $\Delta\psi$  может быть обусловлена переключением комплексов дыхательной цепи на режим работы, при котором транспорт электронов не сопровождается векторным переносом  $H^+$  из матрикса в межмембранное пространство [4]. Следовательно, способность ГДК стимулировать дыхание митохондрий печени также можно рассматривать как действие «десопрягающего» агента, переключающего комплексы дыхательной цепи на холостой режим работы.

В присутствии 20 мМ хлорида калия в инкубационной среде ГПК (25 и 50 мкМ) индуцирует интенсивное снижение оптической плотности суспензии митохондрий, что свидетельствует о высокоамплитудном набухании органелл. При этих условиях ПК и ГДК не влияют на оптическую плотность суспензии митохондрий и, следовательно, не индуцируют их набухания. Хлорид магния в концентрации 3 мМ полностью устраняет индуцируемое ГПК набухание митохондрий. Можно предположить, что в отличие от ПК и ГДК, ГПК способна транспортировать ионы калия через внутреннюю мембрану митохондрий. По-видимому, стимуляция свободного окисления в митохондриях печени ГПК обусловлена комбинацией ее протонофорных и ионофорных эффектов.

В следующих опытах было исследовано влияние ГДК и ГПК на генерацию  $H_2O_2$  митохондриями печени. При проведении исследований эффекты этих жирных кислот были сравнены с действием пальмитиновой кислоты – известного ингибитора генерации  $H_2O_2$ . Как известно, митохондрии сердца, энергизованные путем окисления сукцината, наиболее интенсивно генерируют  $H_2O_2$  в условиях обратного транспорта электронов, и скорость этого процесса существенно снижается ротеноном [1]. В отсутствие ротенона, т.е. в условиях наличия обратного транспорта электронов, пальмитиновая кислота уже в концентрациях 6 и 8 мкМ (30 и 40 нмоль на 1 мг белка) ингибирует генерацию  $H_2O_2$  митохондриями печени на 40%. ГПК приблизительно в той же степени ингибирует генерацию  $H_2O_2$  митохондриями при более высоких концентрациях – 12 и 16 мкМ (60 и 80 нмоль на 1 мг белка). Аналогичный эффект ГДК наблюдается при концентрациях 30 и 40 мкМ (150 и 200 нмоль на 1 мг белка). В присутствии ротенона, т.е. при условии ингибирования обратного транспорта электронов, пальмитиновая кислота, ГПК и ГДК в концентрациях 8, 16 и 40 мкМ соответственно также снижают генерацию  $H_2O_2$  митохондриями печени.

**Заключение.** Продукты  $\omega$ -окисления пальмитиновой кислоты – ГПК и ГДК стимулируют дыхание изолированных митохондрий печени в состоянии 2 различными путями. ГПК стимулирует дыхание и снижает  $\Delta\psi$  в митохондриях в той же степени, как это характерно для пальмитиновой кислоты и классических протонофорных разобщителей, и такое ее действие обусловлено сочетанием протонофорного эффекта с содействием транспорта  $K^+$  и, возможно, катионов трис в матрикс. В отличие от этого стимуляция дыхания митохондрий ГДК не сопровождается снижением  $\Delta\psi$  и подавляется 10 мкМ циклоспорином А. ГДК рассматривается как «десопрягающий» агент, переключающий комплексы дыхательной цепи митохондрий на холостой режим работы.

Пальмитиновая кислота, ГДК и ГПК в концентрациях, вызывающих приблизительно в равной степени стимуляцию дыхания митохондрий в состоянии 2, одинаково эффективно ингибируют генерацию  $H_2O_2$ . Предполагается, что эффекты указанных жирных кислот как

ингибиторов генерации  $H_2O_2$  в митохондриях печени обусловлены стимуляцией дыхания различными путями и могут быть не связаны со снижением  $\Delta\psi$ .

#### *Список литературы*

1. Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. Мембранная биоэнергетика. М.: Издательство Московского университета. 2010. 368 с.
2. Samartsev V.N., Smirnov A.V., Zeldi I.P., Markova O.V., Mokhova E.N., Skulachev V.P. Involved of aspartate/glutamate antiporter in fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997; 1339, 251–257.
3. Дубинин М. В., Самарцев В. Н., Старинец В. С., Хорошавина Е. И., Белослудцев К. Н. Индукция  $\alpha$ ,  $\omega$ -гексадекандикарбоновой кислотой  $Ca^{2+}$ -зависимой пермеабилитации митохондрий печени блокируется неорганическим фосфатом в присутствии циклоспорина А. *Биологические мембраны.* 2018. Т. 35. №5. С. 469-478.
4. Адакеева С.И., Дубинин М.В., Самарцев В.Н. Малонат как ингибитор индуцированного жирными кислотами циклоспорин А-чувствительного кальций-независимого свободного окисления в митохондриях печени. *Биол. Мембраны.* 2015; Т.32. С.41-51.

*Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации №МК-61.2019.4*

### **СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БЕТУЛИНА И БЕТУЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ**

*Шарапов В.А., Выдрина В.А., Яковлева М.П., Семенова А.А., Ильзоркина А.И., Белослудцев К.Н., Хорошавина Е.И., Дубинин М.В.*

*ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет»*

dubinin1989@gmail.com, 89877010437

**Введение.** Одной из актуальных задач современной биологии и медицины является поиск новых лекарственных молекул, обладающих высокой эффективностью. К таким соединениям, сочетающим доступность и высокую биологическую активность, относятся растительные тритерпеноиды. Одними из наиболее перспективных соединений являются тритерпеноиды лупанового ряда: бетулин и его производные [1]. Ранее для таких соединений были выявлены митохондриально-направленные эффекты, связанные с их влиянием на проницаемость мембран этих органелл и экспрессию ряда белков [2]. В настоящей работе нами изучено влияние бетулина и его производного – бетулоновой кислоты (рис. 1) на функциональную активность митохондрий печени крыс.

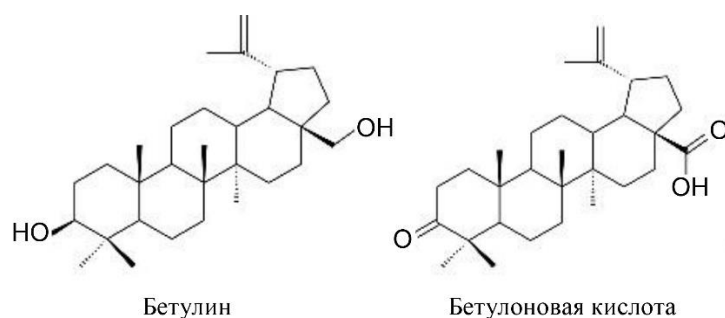


Рис. 1. Структуры соединений, эффекты которых изучались в работе.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводили на митохондриях печени лабораторных крыс, которые выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования. При исследовании окислительного фосфорилирования дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом с помощью системы OxuGraph Plus (Hansatech Instruments). Применяли следующие показатели дыхания и окислительного фосфорилирования:  $J_2$  — скорость дыхания митохондрий в присутствии неорганического фосфата ( $\Phi_n$ ) до добавления АДФ (состояние 2 по Чансу);  $J_3$  — скорость дыхания митохондрий в присутствии  $\Phi_n$  и АДФ (состояние 3 по Чансу);  $J_4$  — скорость дыхания митохондрий в присутствии  $\Phi_n$  после того, как весь добавленный АДФ был израсходован в процессе синтеза АТФ (состояние 4 по Чансу);  $J_u$  — скорость дыхания митохондрий в присутствии 2,4-динитрофенола (разобщенное дыхание);  $RC$  — отношение величин  $J_3$  и  $J_4$  (дыхательный контроль по Чансу). Активность комплексов дыхательной цепи митохондрий печени крыс оценивали спектрофотометрически на планшетном спектрофотометре Multiscan Go (Thermo).

**Результаты.** На первом этапе нами изучено влияние бетулина и бетулоновой кислоты на дыхание митохондрий печени крыс в разных функциональных состояниях в присутствии сукцината, субстрата комплекса II дыхательной цепи. Как видно из таблицы, бетулин в концентрациях 20 и 50 мкМ оказывает слабое влияние на дыхание органелл во всех функциональных состояниях, а также не влияет на величину дыхательного контроля (табл. 1). В то же время бетулоновая кислота уже в концентрации 5 мкМ значительно стимулирует дыхание органелл в состояниях 2 и 4. Для данного эффекта характерна дозозависимость (табл. 1). С другой стороны, бетулоновая кислота также существенно подавляет дыхание митохондрий в состоянии 3, а также разобщенное ДНФ дыхание. При этом показатель дыхательного контроля также снижался (табл. 1).

Таблица 1. Влияние бетулина и бетулоновой кислоты на некоторые показатели дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс в присутствии сукцината

Добавки	$J_2$	$J_3$	$J_4$	$J_u$	$RC$
	нмоль $O_2$ /мин на 1 мг белка				отн. ед.
Контроль	12,28±0,27	67,37±0,43	15,40±0,42	72,7±0,54	4,41±0,19
Бетулин					
20 мкМ	13,41±0,11*	71,68±0,29*	15,79±0,12	78,45±0,38*	4,54±0,14
50 мкМ	13,73±0,14*	70,30±0,05*	16,61±0,04*	76,12±0,09*	4,23±0,09



Бетулоновая кислота					
5 мкМ	19,30±0,47*	56,48±0,17*	23,47±0,43*	67,17±0,20*	2,40±0,09*
10 мкМ	23,89±0,75*	55,07±0,01*	27,71±0,52*	63,67±0,52*	1,99±0,15*
20 мкМ	26,73±0,02*	44,94±0,07*	35,56±1,00*	49,10±1,10*	1,28±0,21*

*Примечание.* Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего ( $n=3$ ). \*Разница между контролем (без добавок) и экспериментом (в присутствии бетулина или бетулоновой кислоты) является статистически значимой ( $p < 0.05$ ).

В следующей части работы нами изучено влияние указанных соединений на активность четырех комплексов дыхательной цепи митохондрий, чтобы определить, что лежит в основе его действия. Как видно из табл. 2, бетулин не влиял на активность дыхательных комплексов I, II и III и на 8% ингибировал активность комплекса III дыхательной цепи митохондрий. Бетулоновая кислота также не оказывала влияния на активность комплексов I и II, но значительно ингибировала активность комплексов III и IV (на 31 и 22% соответственно).

Таблица 2. Активность комплексов дыхательной цепи митохондрий печени крыс в присутствии 30 мкМ бетулина или бетулоновой кислоты (в % от контроля)

Комплекс I	Комплекс II	Комплекс III	Комплекс IV
Бетулин			
104 ± 2	105 ± 3	69 ± 2*	78 ± 3*
Бетулоновая кислота			
95 ± 1	98 ± 5	99 ± 6	92 ± 1*

*Примечание.* Активность комплексов в отсутствие добавок принята за 100%. Приведены средние значения ± ошибка среднего ( $n=3$ ). \*Разница между контролем (без добавок) и экспериментом (в присутствии бетулина или бетулоновой кислоты) является статистически значимой ( $p < 0.05$ ).

**Обсуждение.** Биологические свойства бетулина и его производных хорошо известны. Для этих тритерпеноидов описаны антисептические, противовирусные (ВИЧ, вирус герпеса и Эпштейн-Барра), противовоспалительные, гепатопротекторные, антиоксидантные и другие эффекты [1,3]. Учитывая гидрофобную природу этих соединений, неудивительно, что их основной мишенью в клетке являются мембранные структуры, в частности, мембраны митохондрий. Действительно, как установлено в настоящей работе, бетулин и его производное бетулоновая кислота способны влиять на функциональное состояние этих жизненно важных органелл. При этом наибольшей эффективностью обладает бетулоновая кислота, которая, с одной стороны, активизирует дыхание органелл в состояниях 2 и 4, таким образом оказывая разобщающее действие. С другой стороны, нами установлено, что бетулоновая кислота способна подавлять продукцию АТР митохондриями. В основе этого эффекта бетулоновой кислоты лежит ингибирование работы дыхательной цепи митохондрий, поскольку снижается не только скорость дыхания в состоянии 3 (что говорило бы в пользу ингибирования F1-субъединицы АТР-азы митохондрий), но и скорости ДНФ-стимулированного дыхания (табл. 1). Исследование активности дыхательных комплексов митохондрий показало, что бетулоновая кислота действительно подавляет работу комплекса III (убихинол-цитохром *c*-редуктаза) и комплекса IV (цитохром *c*-оксидаза) дыхательной цепи (табл. 2). В то же время исходное соединение бетулин оказывал слабое влияние на активность дыхательных комплексов.

**Заключение.** Таким образом, полученные нами данные позволяют говорить, что бетулоновая кислота и, в меньшей степени бетулин, способны индуцировать митохондриальную дисфункцию. В основе такого эффекта этих соединений может лежать ингибирование митохондриального дыхания. Можно полагать, что подобные процессы способны приводить к коллапсу мембранного потенциала и усиленной продукции активных форм кислорода и, как следствие этого, к гибели клетки. Это стоит учитывать при разработке новых высокоэффективных лекарственных агентов на основе бетулина.

#### *Список литературы*

1. Г. А. Толстикова, О. Б. Флехтер, Э. Э. Шульц, Л. А. Балтина, А. Г. Толстикова. Бетулин и его производные. химия и биологическая активность. Химия в интересах устойчивого развития. 2005; 13: 1–30.
2. A. Hordyjewska, A. Ostapiuk, A. Horecka, J. Kurzepa. Betulin and betulinic acid: triterpenoids derivatives with a powerful biological potential. *Phytochemistry Reviews* 2019; V.18, №3: 929-951.
3. Т. Г. Толстикова, И. В. Сорокина, А. Г. Толстикова, Г. А. Толстикова, О. Б. Флехтер Терпеноиды ряда лупана – биологическая активность и фармакологические перспективы I. Природные производные лупана. *Биоорганическая химия*. 2006; Т. 32. №1: 42-55.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента РФ для поддержки молодых ученых (МК-61.2019.4).*

## **Индукция аутофагии в лимфоцитах периферической крови на модели травмы спинного мозга у крыс**

Ямалитдинова Э. И., Балтин М.Э., Сабирова Д. Э., Даюб А. Р., Балтина Т. В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет

[yamalitdinova\\_elvira@mail.ru](mailto:yamalitdinova_elvira@mail.ru), 89373627491

**Введение.** В настоящее время особый интерес вызывает изучение аутофагии — процесса, способствующего не только гибели поврежденных клеток, но и их сохранению. Предыдущие исследования на моделях контузионной травмы спинного мозга у крыс выявили важные изменения в аутофагическом процессе. Однако точный характер этих изменений остается спорным. Некоторые авторы описали значительное увеличение численности аутофагосом в течение первых 24 ч после травмы спинного мозга (ТСМ) на основании изменения уровней экспрессии маркера LC3B, тогда как другие выявили только отсроченное увеличение этого маркера через 3-7 суток после повреждения. Также остается спорным вопрос о том, связано ли увеличение численности аутофагосом с началом аутофагического процесса или с блокировкой на последних стадиях аутофагического потока.

Ранее было найдено, что экспрессия Beclin 1 увеличивается после ТСМ, подтверждая увеличение инициации аутофагии. В других работах, сообщалось о нарушениях фазы деградации потока. Разногласия распространяются на функциональные последствия измененной аутофагии, которые могут привести к гибели клеток или защитить клетки после повреждения. Р62 является многофункциональным белком, расположенным по всей клетке и

участвующим во многих путях трансдукции сигнала. Протеотоксический стресс, вызванный ингибированием протеасом, может активировать аутофагию через фосфорилирование p62. Кроме того, делеция p62 приводит к нарушению образования LC3B, агресомы и аутофагосомы, усугубляя повреждение клеток и снижая их жизнеспособность. В целом p62 относится к образованию убиквитин-позитивных включений и связывает LC3B для облегчения аутофагической деградации. Исследование сигнальных механизмов, связанных с повреждением спинного мозга у крыс, открывает новые перспективы в предупреждении и лечении ТБСМ.

**Материалы и методы.** В ходе экспериментов было обследовано 24 нелинейных лабораторных крыс весом 150-200г. Под комбинированным внутримышечным наркозом с использованием «Zoletil 50» 1 мг/кг и ксилавета инъекционного 0,05 мл/кг – 0,10 мл/кг производили животным стандартную открытую контузионную спинномозговую травму на уровне грудного позвонка (Th 8-9) по модифицированной методике A. R. Allen. Результаты оценивали до нанесения ТСМ, после 6, 12 часов и на 1, 3, 7, 14, 21, 30 сутки после ТСМ. Все эксперименты были выполнены с соблюдением биоэтических норм.

Было выделено 2 экспериментальные группы:

1. Животные без контузионной ТСМ (n=3).
2. Животные с ламинэктомией и контузионной ТСМ (n=21).

Забор крови осуществляли путем пункции сердца. Мазки окрашивали по методу Романовского-Гимзы, подсчет лейкоцитов ввели методом меандры. Для забора крови использовали антикоагулянтные пробирки содержащие ЭДТА К2. Лимфоциты периферической крови выделяли методом седиментации в градиенте плотности фиколл—урографина ( $\rho=1,077$ ). Оценку уровня экспрессии белка аутофагии (LC3B, beclin-1, p62) проводили в лимфоцитах крови. Для разделения клеточных белков использовали метод электрофореза в 15% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфат натрия. Детектировали хемилюминисценцию целевых белков с помощью геля — хемидокументирующей системы ChemiDoc™XRS+. Статистическую обработку проводили с использованием программы SigmaPlot 11.0.

**Результаты и обсуждение.** Главным активатором аутофагии является белок beclin-1. Вследствие клеточного стресса увеличивается экспрессия данного белка на 1 сутки после повреждения, что вероятно привело к избирательной нуклеации клеточных компонентов в острой фазе ТСМ. Одновременное снижение уровня белка beclin-1 и p62 на 3 сутки привело к ускоренному клеточному делению, вызванное снижением концентрации питательных веществ в клетках после повреждения. Регуляция beclin-1 является главным механизмом контроля аутофагии.

LC3 является одним из наиболее распространенных маркеров индукции аутофагии и может быть связан с убиквитинированными субстратами с помощью p62, маркера аутофагического потока.

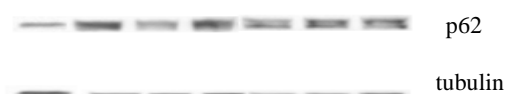
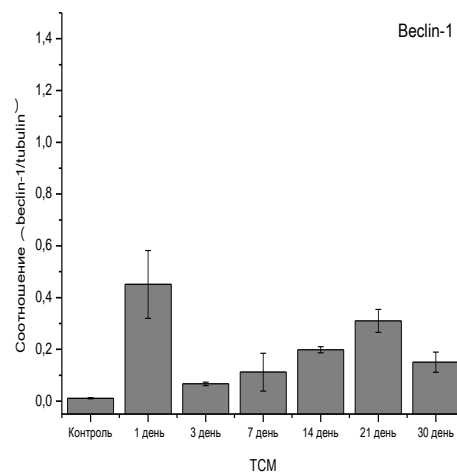
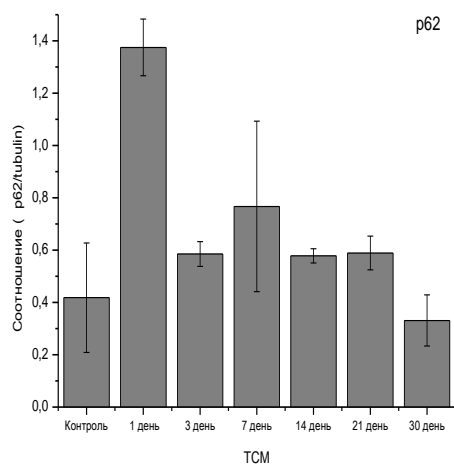


Рис.1. Содержание p62/тубулина после травмы спинного мозга (ТСМ)



Рис.2. Содержание Beclin-1/тубулина после травмы спинного мозга (ТСМ)

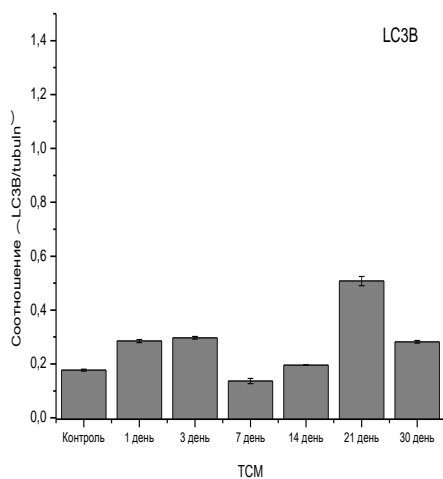


Рис.3. Содержание LC3B/тубулина после травмы спинного мозга (ТСМ)

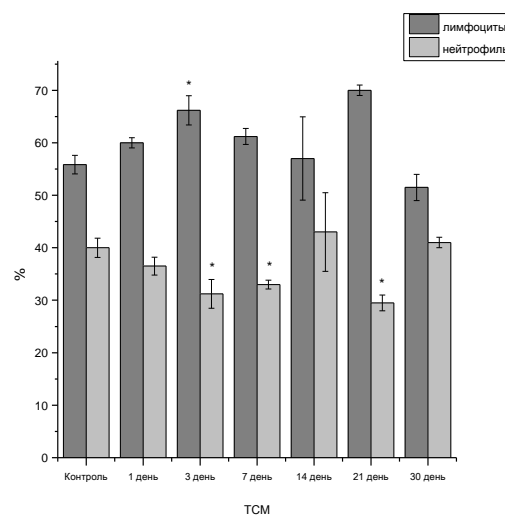


Рис.4. Соотношение лимфоцитов и нейтрофилов после травмы спинного мозга (ТСМ);

\* - достоверность отличий значений по отношению к контролю,  $p < 0.05$

Ингибирование процесса аутофагии приводит к заметному накоплению p62 на 1 сутки после ТСМ, в результате которого образуются позитивные включения p62 до 21 суток после повреждения. В последующем данный белок взаимодействует с LC3 и разрушается в процессе аутофагии.

Повышение уровня белка LC3B был отмечен на 21 сутки после ТСМ, что свидетельствует о патологическом процессе, приводящим к накоплению большего числа аутофагосом внутри клетки. Одновременное увеличение экспрессии белка beclin-1 и LC3B на 21 сутки после повреждения, относительно контроля, свидетельствует об индукции аутофагии. Возникновение

лимфоцитоза на 21 день после повреждения подтверждает наличие патологического состояния клетки после ТСМ. В данном случае наблюдается не завершенная аутофагия.

**Заключение.** Основываясь на полученных данных, мы предположили, что аутофагия играет важную роль в проявлении повреждения клеток после ТСМ. Однако установление того, являются ли эти временные различия косвенными или представляют собой реальное невропатологическое различие, требует дополнительных исследований. Роль аутофагии при ТСМ остается спорной.

#### *Список литературы*

1. И.А. Кочергин, А.И. Тухватулин, Д.Ю. Логунов, М.Н. Захарова. Активация аутофагии в периферических мононуклеарных клетках при боковом амиотрофическом склерозе. Клиническая неврология. Том 10. №4. 2016.
2. Е.Ю.Кочеткова, Г.И.Блинова, В.А.Поспелов, Т.В.Поспелова. MEK/ERK-путь необходим для поддержания цитопротективной аутофагии после облучения трансформантов E1A+cHa-Ras. Цитология 2016, No58 (12): 947 –954.
3. T.E. Anderson. A Controlled pneumatic technique for experimental spinalcord contusion. J. Neurosci. Methods. – 1982. – V.6, №4. – P.327-333.
4. V. Kirkin, DG. McEwan, I. Novak, I. Dikic. A role for ubiquitin in selective autophagy. Mol Cell. 2009. DOI10.1016/C2009-04-026.
5. Y. Ichimura, T. Kumanomidou, YS. Sou, T. Mizushima, J. Ezaki, T. Ueno, E. Kominami, T. Yamane, K. Tanaka, M. Komatsu. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. J Biol Chem. 2008. DOI10.1074/M802182200.

*Поддержан грантом РФФИ № 18-315-00267*

## Секция «Ферменты нуклеинового обмена»

### ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПЕПТИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ – БИНАЗЫ

*Дудкина Е.В., Сурченко Ю.В., Ульянова В.В*

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

[lenatimonina@rambler.ru](mailto:lenatimonina@rambler.ru), 89376268280

**Введение.** Традиционное лечение рака теряет свой терапевтический эффект ввиду низкой селективности применяемых препаратов, лекарственной устойчивости злокачественных клеток и высоким уровнем побочных эффектов химиотерапевтических агентов [Marqus et al., 2017]. Терапевтические пептиды представляют собой новый перспективный подход, применяемый в различных аспектах медицины, в виде противоопухолевых вакцин, для доставки нуклеиновых кислот и в составе антимикробной терапии [Domalaon et al., 2016]. Изучение свойств терапевтических пептидов показало их явное преимущество перед другими противоопухолевыми агентами, включающее: короткие временные рамки взаимодействия (что снижает вероятность возникновения резистентности), простота синтеза, высокая специфичность и селективность в отношении внутриклеточных мишеней, хорошее проникновение в опухоль и низкая токсичность [Figueiredo et al., 2014; Domalaon et al., 2016]. Многие терапевтические пептиды воздействуют на пути передачи межклеточных сигналов, а именно влияют на функционирование сигнального пути Ras/Raf/MEK/ERK [Marqus et al., 2017]. Ранее нами было показано, что противоопухолевое действие рибонуклеазы *Bacillus pumilus* 7P - биназы на gas-экспрессирующие клеточные линии опосредовано ее прямым взаимодействием с белком KRAS [Ilinskaya et al., 2016]. Это взаимодействие приводит к ингибированию сигнального пути MAPK/ERK и вызывает гибель раковых клеток. Мы предположили, что небольшие пептиды, полученные на основе биназы будут обладать более специфическим и эффективным ингибирующим действием на раковые клетки с минимальными побочными эффектами и иммуногенностью по сравнению с полноразмерным аутентичным белком.

**Материалы и методы.** Препарат рибонуклеазы *Bacillus pumilus* – биназы (12.3 кДа, рI 9.5) выделен и очищен согласно методике, описанной ранее [Dudkina et al., 2016]. Пептиды биназы синтезированы компанией «GenScript Corporation» (США).

Клеточная линия аденокарциномы легких человека (A549) получена из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Россия). Клетки выращивали при 37° С на стандартной среде RPMI с добавлением 5% телячьей сыворотки и пенициллина/стрептомицина (по 100 ед.) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

Жизнеспособность клеток определяли в соответствии с активностью митохондриальных NAD(P)H-зависимых оксидоредуктаз, согласно стандартной методике. Клетки обрабатывали биназой и ее пептидами в концентрациях 5 и 50 мкМ, и инкубировали 48 часов. Оптическую плотность измеряли при 570 нм (xMark, Bio-Rad, США). Жизнеспособность необработанных клеток была принята за 100%.

**Результаты.** На основе первичной последовательности биназы были синтезированы пептиды, соответствующие регионам биназы с 1 по 20 а.о. (B120), с 21 по 50 а.о. (B2150), с 51 по 73 а.о. (B5173), с 74 по 94 а.о. (B7494), с 95 по 109 а.о. (B95109) и с 103 по 109 а.о. (B103109). Цитотоксичность полученных пептидов биназы оценивали с помощью МТТ-теста на клетках аденокарциномы легких человека А549. Клетки обрабатывали пептидами биназы в концентрациях 5 и 50 мкМ в течение 48 часов. В ходе работы был продемонстрирован цитотоксический потенциал у пептида B2150 в концентрации 50 мкМ, жизнеспособность клеток составила 84%, что соответствовало цитотоксическому эффекту биназы в этой же концентрации по сравнению с необработанными клетками. Снижение жизнеспособности клеток до 70% было отмечено также в варианте обработки пептидом биназы B7494 в концентрации 5 мкМ, тогда как в концентрации 50 мкМ токсического эффекта не наблюдалось. Остальные пептиды биназы не влияли на метаболическую активность клеток аденокарциномы легких человека А549.

**Обсуждение.** На сегодняшний день известны противоопухолевые пептиды, действие которых опосредовано их взаимодействием с онкогенным белком KRAS. Так, показано, что введение пептидов PNC-2 и PNC-7 (96 и 37 а.о. соответственно), производных GAP-связывающей области онкогенного белка p21, в раковые клетки приводит к реверсии гас-трансформированных опухолевых клеток крысы TUC-3 к их исходному фенотипу [Adler, 2008]. В данном исследовании была разработана серия пептидов на основе биназы, и обнаружено, что пептиды B21-50 и B74-94 обладают противоопухолевым потенциалом, схожим с полноразмерным белком, в отношении клеток А549, экспрессирующих KRAS онкоген. Вероятно, области биназы с 21 по 50 а.о. и с 74 по 94 а.о. участвуют во взаимодействии с KRAS белком, что приводит к ингибированию MAPK/ERK сигнального пути и, как следствие, гибели опухолевых клеток.

**Заключение.** Полученные результаты указывают на первостепенную роль структурной организации биназы в ее противоопухолевой активности, и демонстрируют потенциальную возможность использования пептидов на основе биназы в качестве потенциальных противораковых препаратов нового поколения.

#### *Список литературы*

1. V. Adler , W. Bowne, I. Kamran, J. Michl, F.K. Friedman, E. Chin, M. Zenilman, M.R. Pincus. Two peptides derived from ras-p21 induce either phenotypic reversion or tumor cell necrosis of ras-transformed human cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;62:491–498
2. R. Domalaon, B. Findlay, M. Ogunsina, G. Arthur, F. Schweizer. Ultrashort cationic lipopeptides and lipopeptoids: evaluation and mechanistic insights against epithelial cancer cells. *Peptides.* 2016; 84: 58–67.
3. E. Dudkina, V. Ulyanova, R. Shah Mahmud, V. Khodzhaeva, L. Dao, V. Vershinina, A. Kolpakov, O. Pinskaya. Three-step procedure for preparation of pure *Bacillus altitudinis* ribonuclease. *FEBS Open Bio.* 2016; 6: 24-32.
4. S. Marqus, E. Pirogova, T. Piva. Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. *J. Biomed. Sci.* 2017; 24: 21.
5. O. N. Pinskaya, I. Singh, E.V. Dudkina, V.V. Ulyanova, A. Kayumov, G. Barreto, G. Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase). *Biochimica et Biophysica Acta.* 2016; 1863: 1559-1567.

*Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности КФУ и поддержана грантом РФФИ 18-74-00108.*

# ПОИСК НОВЫХ ПРОДУЦЕНТОВ СЕКРЕТИРУЕМЫХ РНКАЗ В ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ МОРЯ ЛАПТЕВЫХ

Курди.У., Яковлева Г.Ю., Ильинская. О.Н

Казанский федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии,  
каф. микробиологии  
[william.m.kurdy@hotmail.com](mailto:william.m.kurdy@hotmail.com), телефон: +79375853783

**Введение.** Бактериальные внеклеточные РНКазы секретируются преимущественно представителями рода *Bacillus* [1], которые были выделены из различных экологических ниш. Многие РНКаз обладают противовирусным [2] и противоопухолевым действием [3]. Поэтому поиск новых продуцентов внеклеточных РНКаз является весьма актуальной задачей.

В последнее время большое внимание уделяется микроорганизмам, которые способны обитать в экстремальных условиях. Море Лаптевых является наиболее суровым водоемом в Арктике. Это одно из окраинных морей Северного Ледовитого океана расположенное между полуостровом Таймыр и Новосибирскими островами. Как и для большинства районов Арктики в литературе имеется недостаточно данных о составе микробных сообществах данного региона. Работы связаны лишь изучением функционирования планктонных микробных сообществ [4], в то время как данные о микрофлоре донных отложений полностью отсутствуют.

Целью данной работы является анализ микробного разнообразия донных отложений моря Лаптевых и поиск новых продуцентов экзогенных РНКаз.

**Материалы и методы.** В работе использовали образцы проб грунта (№ 1 и 4) из района метановых газовыделений, "сиповые" станции и с различных глубин "фоновых" станций (№ 2 и 3) моря Лаптевых, полученных в ходе экспедиции 73-го рейса НИС "Академик Мстислав Келдыш" (3-17 октября 2018г).

Был проведен метагеномный анализ с использованием системы секвенирования ILLUMINA. Полученные результаты были проанализированы с помощью программного обеспечения Mothur.

Чистые культуры культивируемых микроорганизмов были получены путем глубинного посева на среды общего назначения. Часть из них была идентифицирована с помощью масс-спектрометрического анализа (MALDI-TOF MS).

РНКазную активность определяли чашечным методом на бесфосфорной среде с добавлением РНК в концентрации 5 мг/мл. Коэффициент РНКазной активности определяли как отношение диаметра колоний с учётом зоны просветления к диаметру колоний без зоны просветления.

**Результаты.** Во всех исследуемых пробах преобладали представители домен *Bacteria* (95%). В одной пробе из района метановых газовыделений (№4) наряду с представителями домена *Bacteria* (75%) были определены микроорганизмы, входящие в домен *Archaea* (19%). Большой процент микроорганизмов, отнесенных к домену *Bacteria*, идентифицировать не удалось (рис. 1). Из идентифицированных бактерий представители филума *Poteobacteria* преобладали во всех образцах. Их количество составляло 23.6, 40.0, 29,4 и 29.7% соответственно. В образце № 4 были определены представители филума *Euryarchaeota*, количество которых составляло 19% от общего числа ортогорупп, в то время как в других



образцах микроорганизмов, относящихся к данной филе, было менее 1%. Из представителей филюма *Poteobacteria* во всех образцах присутствовали бактерии, относящиеся к классу *Deltaproteobacteria*. Наибольшее их количество отмечалось в образце № 4. Кроме представителей класса *Deltaproteobacteria* в образцах № 1-3 были определены бактерии класса *Gammaproteobacteria*. Причем их количество в данных образцах в процентном отношении было максимальным.

Из образцов грунта было выделено 27 изолятов аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов, из которых 16 обладали РНКазной активностью (рис. 2). Максимальная активность отмечалась у изолятов 12 и 24 (коэффициент РНКазной активности  $2.0 \pm 0.1$ )

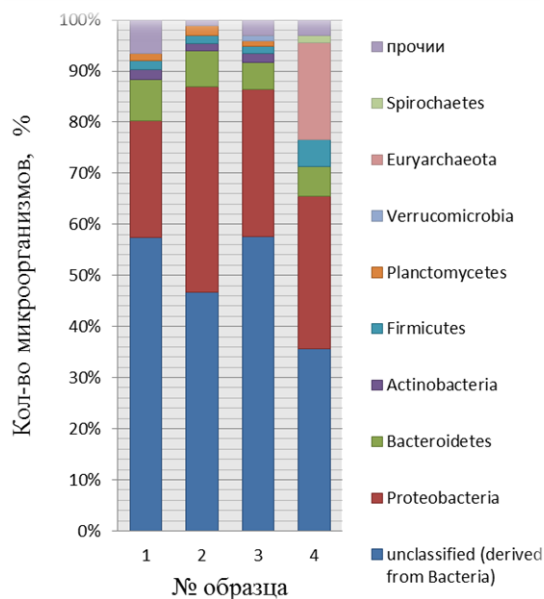


Рисунок 1 – Доминирующие филы в образцах донных отложений моря Лаптевых. Представитель с процентом встречаемости менее 1% отнесены к группе «прочие».

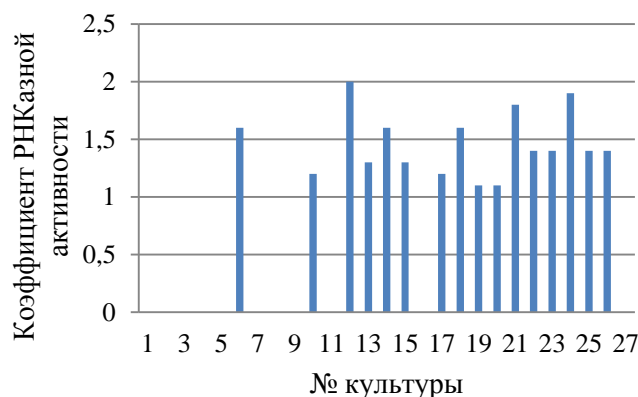


Рисунок 2 – РНКазная активность бактерий, выделенных из образцов донных отложений моря Лаптевых.

**Обсуждение.** Изучение экстремальных мест обитания связано не только с открытием новых видов микроорганизмов, но и с поиском продуцентов биологически активных веществ. Ранее уже было показано, что средний объем бактериопланктона моря Лаптевых был ниже, чем этот показатель в глубоководном районе Карского и Баренцева морей [4, 5]. Однако, видовой состав, как планктона, так и донных отложений не исследовался. С помощью метагеномного анализа нам удалось идентифицировать представителей 8 фил микроорганизмов и выделить преобладающие группы. Наличие в образцах микроорганизмов, отнесенных к домену *Bacteria*, которые нам не удалось классифицировать, дает нам основание предположить, что это новые, ранее не описанные виды, приспособившиеся к жизни в морях крайнего север.

На сегодняшний день известно большое количество РНКаз, которые обладают избирательным цитотоксическим действием в отношении к опухолевым клеткам [3]. Выделенные нами из донных отложений моря Лаптевых микроорганизмы, обладающие РНКазной активностью, возможно, внесут свой вклад в создание новых терапевтических

средств, которые будут обладать направленным поражающим действием в отношении раковых клеток с минимальным побочным эффектом к нормальным клеткам организма.

**Заключение.** Микробиом 4 образцов донных отложений моря Лаптевых представлен доменами *Bacteria* и *Archaea* (только образец № 4). Среди домена *Bacteria* наибольшее количество бактерий отнесено к филу *Poteobacteria*, классу *Deltaproteobacteria*.

Из 27 выделенных изолятов аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов 59 % обладали РНКазной активностью.

#### *Список литературы*

1. V. Ulyanova, R. Shah Mahmud, E. Dudkina, V. Vershinina, E. Domann, O. Ilinskaya. Phylogenetic distribution of extracellular guanyl-preferring ribonucleases renews taxonomic status of two bacillus strains. *Journal of General and Applied Microbiology*. 2016; 62(4): 181-188.

2. О. Ильинская, Р. Шах Махмуд. Рибонуклеазы как противовирусные агенты. *Молекулярная биология*. 2014; 48(5): 707-717.

3. O. Ilinskaya, I. Singh, E. Dudkina, V. Ulyanova, A. Kayumov, G. Barreto. Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase). *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*. 2016; 1863: 1559-1567.

4. А.И. Копылов, А.Ф. Сажин, Е.А. Заботкина, А.В. Романенко, Н.Д. Романова, П.Р. Макаревич, М.П. Венгер. Вирусы, бактерии и гетеротрофные нанофлагелляты в планктоне моря Лаптевых. *Океанология*. 2016; 56(6): 869-878.

5. Howard-Jones M.H., Ballard V.D., A.E. Allen. Distribution of bacterial biomass and activity in the marginal ice zone of the central Barents Sea during summer. *J. of Marine Systems*. 2002; 38: 77-91.

#### *Благодарности*

Авторы выражают глубокую благодарность д.б.н. Николаю Викторовичу Пименову за предоставление образцов донных отложений моря Лаптевых.

## **АНТИИНВАЗИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ**

### ***BACILLUS PUMILUS***

*Надырова А.И., Сироткина А.А., Зеленихин П.В., Ильинская О.Н.*

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

alsu.nadyrova@yandex.ru, 89631209430

**Введение.** Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения, онкологические заболевания являются второй из основных причин смертности во всем мире. Образование метастазов в отдаленных органах и тканях обычно сопряжено со смертельным исходом. Ключевыми процессами, обуславливающими метастазирование, являются инвазия и миграция опухолевых клеток из первичного очага в близлежащие ткани. В связи с этим ведется активный поиск антиметастатических агентов, снижающих способность злокачественных клеток к инвазии. Цель данной работы состояла в анализе способности

рибонуклеазы (РНказы) *Bacillus pumilus* (биназы) подавлять миграцию опухолевых клеток различного происхождения в тесте на зарастание царапины.

**Материалы и методы. Фермент.** В работе использована гуанилспецифичная РНказа *B. pumilus* 7P дикого типа (ЕС 3.1.27.3), молекулярная масса мономера 12.2 кДа, 109 аминокислотных остатков, pI = 9.5).

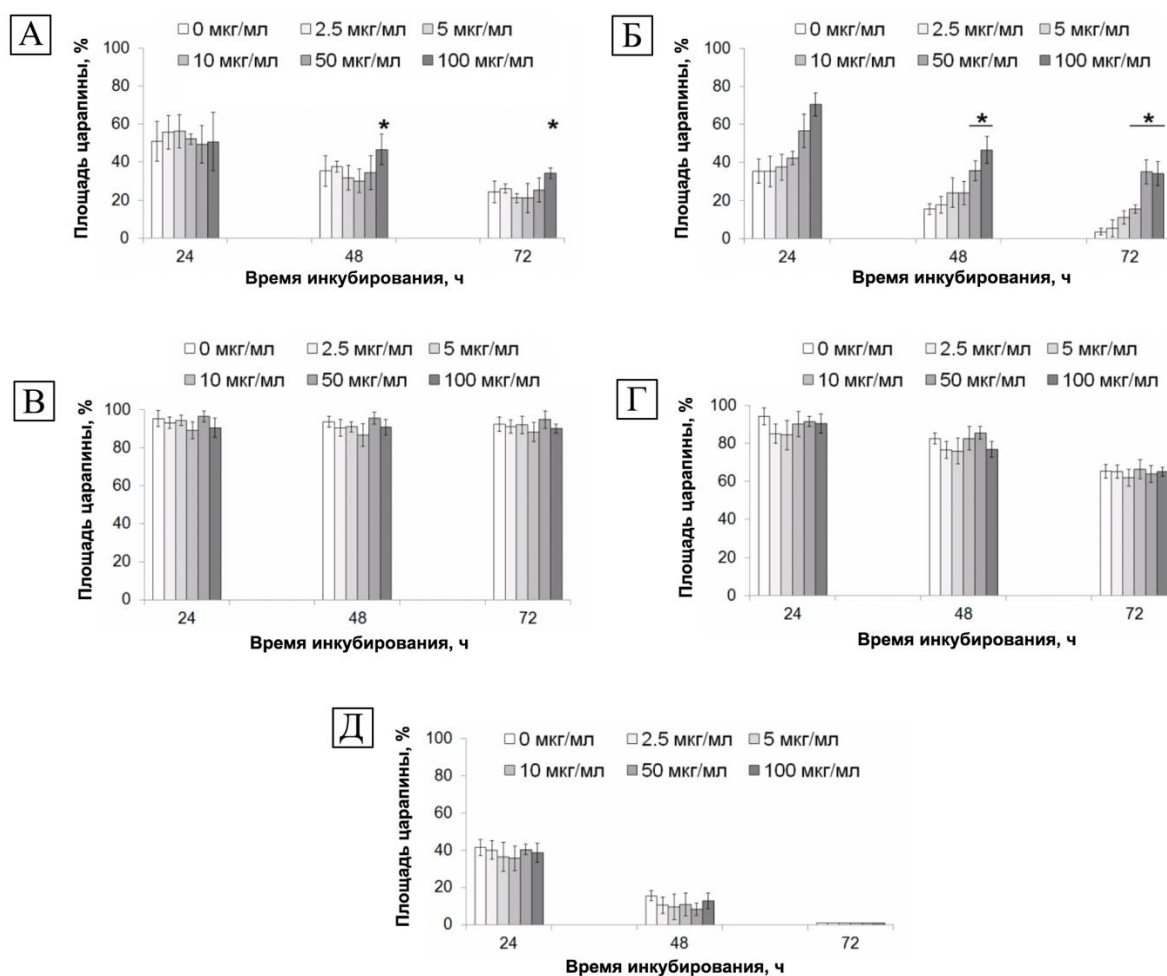
**Условия культивирования и оценка миграции клеток.** Линии клеток рака легкого человека A549, печени HepG2, молочной железы MCF-7, двенадцатиперстной кишки HuTu 80, а также меланомы B16 мыши (коллекция ATCC, США) культивировали при 37°C в среде DMEM (Invitrogen, США) с добавлением пенициллина/стрептомицина (по 100 ед./мл) и 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота. Клетки высевали в 12-луночные культуральные планшеты (20000 клеток на лунку) и выращивали до образования полного монослоя. Перед началом эксперимента по поверхности монослоя при помощи наконечника для автоматической пипетки (200 мкл) проводили максимально идентичные для всех культур прямые линии, очищая от клеток полосу шириной ~1.0–1.25 мм, и заменяли среду на аналогичную, содержащую биназу (2.5–300 мкг/мл). Изображения образцов (не менее 20 в каждом варианте) в репрезентативных участках незанятых клетками областей фиксировали в нулевой временной точке, а затем после культивирования в течение 24, 48 и 72 ч с использованием камеры Olympus SC35 (Япония). Площадь не занятой клетками ростовой поверхности измеряли с использованием сервисной опции “Free hand selection” компьютерной программы ImageJ.

**Статистика.** Статистическую обработку результатов проводили в программном пакете GraphPad Prism. При множественном сравнении групп данных использовали тест ANOVA. При этом  $p \leq 0.05$  считали достаточным уровнем значимости различий.

**Результаты.** Было показано, что биназа в концентрации 10 мг/мл после инкубации в течение 72 ч не влияла на миграцию клеток HepG2, MCF-7 и A549 (рис. 1А, В, Г). Вместе с тем HuTu 80 оказались чувствительными к низкой концентрации биназы: через 48 ч миграционная активность клеток понизилась на 66% (рис. 1Б).

Снижение миграционной активности клеток A549 наблюдалось только при инкубации с биназой в концентрации 100 мкг/мл (рис. 1А). Не обнаружено антимиграционного действия биназы на клетки меланомы B16. Таким образом, антимиграционному действию биназы подвержены две из пяти линий опухолевых клеток.

**Обсуждение.** РНказа *Bacillus pumilus*, биназа, является перспективным агентом, проявляющим избирательность действия по отношению к линиям опухолевых клеток, экспрессирующих онкогены *ras*, KIT, AML/ETO [1, 2], а также подавляющим метастазирование опухолей у животных [3]. Ранее было показано, что биназа взаимодействует непосредственно с мутантным белком K-RAS<sup>G12D</sup>, тем самым блокируя сигнальный путь MAPK/ERK и индуцируя апоптоз [4]. Клетки HuTu 80, MCF-7 и B16 экспрессируют онкогены RAS дикого типа. Клетки A549 содержат мутантный K-RAS<sup>G12S</sup>, а клетки HepG2 – мутантный N-RAS<sup>Q61L</sup>. По-видимому, ингибирование биназой функций мутантного K-RAS в клетках A549 играет важную роль как в подавлении их пролиферации, так и миграции (1А), однако, мутантный K-RAS не может рассматриваться как универсальная мишень действия биназы.



**Рис. 1.** Влияние биназы на миграционную активность клеток A549 (А), HuTu 80 (Б), HepG2 (В), MCF-7 (Г) и B16 (Д).

В клетках HuTu 80 биназа в малых концентрациях запускает иные механизмы ингибирования миграции. В этих клетках очень высок уровень экспрессии металлопротеиназ семейства ADAM, функция которых заключается в отщеплении внеклеточных фрагментов мембранных белков [база данных GDSC Cell Line Gene Expression Profiles]. Тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMP) ограничивают миграцию опухолевых клеток, поэтому ингибиторы ADAM рассматривают в качестве перспективных противоопухолевых средств [5]. Молекулярное моделирование подтверждает вероятность связывания биназы с каталитическим центром протеиназы ADAM аналогично ее ингибитору.

**Заключение.** Таким образом, экспериментальные результаты подтверждают перспективность дальнейшего изучения биназы как ингибитора инвазии и миграционной активности опухолевых клеток, экспрессирующих мутантный онкоген K-RAS и металлопротеиназы семейства ADAM.

#### Список литературы

1. O. Ilinskaya, K. Decker, A. Koschinski, F. Dreyer, H. Repp. *Bacillus intermedius* ribonuclease as inhibitor of cell proliferation and membrane current. *Toxicology*. 2001; 156: 101-107.
2. V.A. Mitkevich, I.Y. Petrushanko, P.V. Spirin, T.V. Fedorova, O.V. Kretova, N.A. Tchurikov, V.S. Prassolov, O.N. Ilinskaya, A.A. Makarov. Sensitivity of acute myeloid

- leukemia Kasumi-1 cells to binase toxic action depends on the expression of *KIT* and *AML1-ETO* oncogenes. *Cell Cycle*. 2011; 10: 4090-4097.
3. N.L. Mironova, I.Y. Petrushanko, O.A. Patutina, A.V. Sen'kova, O.V. Simonenko, V.A. Mitkevich, O.V. Markov, M.A. Zenkova, A.A. Makarov. Ribonuclease binase inhibits primary tumor growth and metastases via apoptosis induction in tumor cells. *Cell Cycle*. 2013; 12: 2120-2131.
  4. O.N. Ilinskaya, I. Singh, E. Dudkina, V. Ulyanova, A. Kayumov, G. Barreto. (2016) Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase). *Biochim. Biophys. Acta—Mol. Cell Res.* 2016; 1863: 1559-1567.
  5. Y. Zhong, Y.T. Lu, Y. Sun, Z.H. Shi, N.G. Li, Y.P. Tang, J.A. Duan. Recent opportunities in matrix metalloproteinase inhibitor drug design for cancer. *Expert. Opin. Drug Discov.* 2018; 13: 75-87.

*Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности КФУ и поддержана грантом РФФИ 17-00-00061 (КОМФИ).*

## Секция « Молекулярные основы медицинской биохимии»

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТЫ $K_{SS}$ ХОЛИНЭСТЕРАЗ ДЛЯ ПРИРОДНОГО СУБСТРАТА АЦЕТИЛХОЛИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КИНЕТИКИ КОНКУРИРУЮЩИХ СУБСТРАТОВ

*Агълямова А. Р., Мухаметгалиева А.Р., Фаттахова А.Н., Массон П.*

Казанский (Приволжский) федеральный университет

klikodali@yandex.ru, +79270420077

**Введение.** Нейромедиаторы играют важную роль в осуществлении многих физиологических и поведенческих функций, и нарушение метаболизма этих соединений способно привести к развитию многих тяжёлых заболеваний, таких как болезнь Паркинсона или болезнь Альцгеймера [4]. Ацетилхолинэстераза (АХЭ) (КФ 3.1.1.7.) и бутирилхолинэстераза (БуХЭ) (КФ 3.1.1.8.) – ферменты, вовлечённые в процесс холинергической передачи и катализирующие реакцию гидролиза основного нейромедиатора парасимпатической нервной системы ацетилхолина, – являются мишенью многих терапевтических препаратов, нацеленных на лечение болезней, связанных с нарушениями мозговой деятельности [3, 5].

**Материалы и методы.** Определение кинетических констант ферментов является необходимым этапом при скрининге и разработке новых лекарственных препаратов. Однако каталитические константы холинэстераз для ацетилхолина невозможно определить, используя классический метод Элмана, основанного на реакции тиохолина и реактива Элмана с образованием окрашенного соединения [1].

Для этого в данной работе в реакционную смесь, помимо целевого субстрата ацетилхолина, внесли второй конкурентный субстрат. В качестве второго хромогенного субстрата использовали ацетанилиновый аналог ацетилхолина, 3-(ацетамидо)-N,N,N-триметиланилин (АТМА) [2].

**Результаты.** В результате определили каталитическую константу  $K_{SS}$  двух холинэстераз для ацетилхолина: 1,5 мМ (АХЭ) и 1,8 мМ (БуХЭ).

**Обсуждение.** Полученные значения констант практически одинаковы для ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы, что свидетельствует об одинаково высоком сродстве ферментов к природному субстрату.

#### *Список литературы*

1. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 1961; 7: 88-95.
2. Johnson J.L., Cusack B., Davies M.P., Fauq A., Rosenberry T.L. Unmasking tandem site interaction in human acetylcholinesterase. Substrate activation with a cationic acetanilide substrate. *Biochemistry*. 2003; 42: 5438 – 5452.

3. Rajeshwari R., Chand K., Candeias E., Cardoso S.M., Chaves S., Santos M.A. // New multitarget hybrids bearing tacrine and phenylbenzothiazole motifs as potential drug candidates for Alzheimer's disease. *Molecules*. 2019; 24: No. 589.

4. Shadlaghani A., Farzaneh M., Kinser D., Reid R.C. Direct electrochemical detection of glutamate, acetylcholine, choline, and adenosine using non-enzymatic electrodes. *Sensors*. 2019; 19: No. 447.

5. Xu Y.L., Li F.Y., Ndikuryayo F., Yang W.C., Wang H.M. Cholinesterases and engineered mutants for the detection of organophosphorus pesticide residues // *Sensors*. 2018. Vol. 18, No. 4281.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ-17-32 (0234/02.34.41036.001).*

## СИНТЕЗ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В КУЛЬТУРАХ МИОЦИТОВ И МЫШЦАХ КРЫСЫ

*Аль-Ибрахим Рахаф<sup>1</sup>, Сибгатуллина Гузель Валерьевна<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> К(П)ФУ, <sup>2</sup> КИББ ФИЦ КазНЦ РАН

[kam-guz@yandex.ru](mailto:kam-guz@yandex.ru)

+79518918313

**Введение.** Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) является основным ингибирующим нейромедиатором в мозге взрослого млекопитающего. При выбросе ГАМК в синаптическую щель происходит активация ионных каналов ГАМК<sub>A</sub>- и ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов, приводящая к ингибированию нервного импульса. Лиганды рецепторов ГАМК рассматриваются как потенциальные средства для лечения различных расстройств психики и ЦНС, к которым относятся болезни Паркинсона и Альцгеймера, расстройства сна (бессонница, нарколепсия), эпилепсия. Следует отметить, что ГАМК была обнаружена в различных тканях за пределами головного и спинной мозга. При этом точные функции ГАМК за пределами ЦНС к настоящему времени пока не установлены.

В 2007 году Borodinsky и Spitzer [1] установили наличие ГАМК в области синаптического контакта между мотонейроном и скелетным мышечным волокном. При этом исследователями было отмечено, что культивируемые миоциты *Xenopus* экспрессируют функциональные ГАМК<sub>A</sub> рецепторы, однако эта экспрессия устраняется после установления полноценного синаптического контакта с мотонейроном. Однако в дальнейшем было показано, что в области зрелого нервно-мышечного контакта млекопитающего присутствуют не только молекулы ГАМК, но и основной фермент ее синтеза L-глутаматдекарбоксилаза (ГАД), трансмембранные транспортеры для аминокислоты [2], а также метаболитные ГАМК<sub>B</sub> рецепторы [3]. Исходя из этого, представляется важным проследить наличие молекул ГАМК и ГАД в скелетной мышечной ткани и мотонейронах на разных этапах онтогенеза.

Иммуноцитохимическое исследование культуры миоцитов и мышечных тканей крысы показало наличие молекул ГАМК, но отсутствие фермента ГАД [4]. Цель данного исследования состоит в подтверждении данных, полученных методом конфокальной микроскопии, а также в выяснении роли ГАМК в мышечных тканях теплокровных животных.

**Материалы и методы.** Работа была проведена на первичных культурах миоцитов и мышечной ткани крысы. Культуры миоцитов получали из икроножных мышц

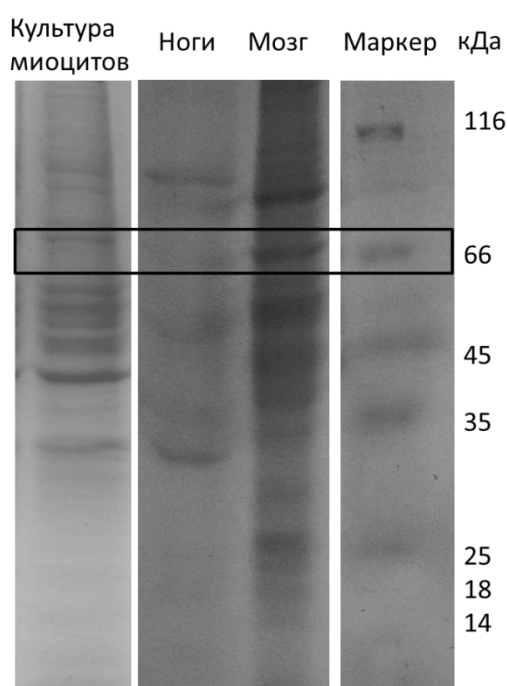


Рис.1. Спектры белков, выделенных из культуры клеток

новорожденных животных (P1-P3) как описано у Das et al [5] и Ionescu et al [6] с модификациями. Разделение белков производили в 10% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях.

**Результаты и обсуждение.** Главным ферментом, синтезирующим ГАМК из глутамата является L-глутаматдекарбоксилаза (ГАД). Известны два типа ГАД, играющие значительную физиологическую роль: ГАД65 и ГАД67, являющихся продуктами разных генов. Отсутствие иммуноположительной реакции с антителами к ГАД65/67 в культивируемых миоцитах может быть вызвано отсутствием в них данного белка. Для проведения исследования необходимо было выделить белки из культуры клеток миоцитов. На первом этапе был осуществлен подбор метода для экстракции белков из культуры. После проведения соответствующих экспериментов нами был выбран протокол, позволяющий получить максимальный

выход белка. На данный момент проведен сравнительный анализ белковых спектров миоцитов и мышечной ткани взрослого животного (рис.1). Было выявлено наличие полосы, близкой к маркерному белку с массой 65-67 кДа, как в культивируемых миоцитах, так и в ткани. Для проведения контроля необходимо было использовать ткань, в которой присутствие ГАД подтверждено в литературе. Для этой цели мы выделили белки из мозга новорожденных крысят (P1-P3). После проведения геле-электрофореза мы выяснили, что в мозге также присутствуют белки с молекулярной массой около 65-67 кДа (рис.1). При этом, при равной загрузке (5 мкг белка на дорожку), количество белка с интересующей нас массой значительно выше в мозге.

**Заключение.** Таким образом, к данному моменту установлено, что в миоцитах и мышечной ткани присутствует белок с молекулярной массой, близкой к 65-67 кДа. Однако, какая молекулярная масса характерна не только для ГАД, но и для таких, как сывороточный альбумин, гемоглобин, альфа-рецептор эстрогена, некоторые виды кератина, гамма-глутамилтранспептидаза. Поэтому в дальнейшем планируется провести вестерн блоттинг с антителами, специфичными к ГАД 65/67.

#### Список литературы

1. Borodinsky LN и Spitzer NC (2007) Activity-dependent neurotransmitter-receptor matching at the neuromuscular junction. Proc Natl Acad Sci USA 104:335-340.
2. Nurullin LF, Nikolsky EE, Malomouzh AI (2018) Elements of molecular machinery of GABAergic signaling in the vertebrate cholinergic neuromuscular junction. Acta Histochem 120:298-301.
3. Malomouzh AI, Nurullin LF, Nikolsky EE (2015) Immunohistochemical evidence of the presence of metabotropic receptors for  $\gamma$ -aminobutyric acid at the rat neuromuscular junctions. Doklady Biochemistry and Biophysics 463:236-238.



4. Сибгатуллина Г.В., Мухитов А.Р., Маломуж А.И. (2018) L-глутаматдекарбоксилаза и гамма-аминомасляная кислота в миоцитах и зрелых мышечных волокнах крысы: иммуноцитохимическое исследование. Материалы XIV Международной научной конференции «Адаптация развивающегося организма». с. 103-104.

5. Das M, Rumsey JW, Bhargava N, Stancescu M, Hickman JJ (2010) A defined long-term in vitro tissue engineered model of neuromuscular junctions. *Biomaterials* 31(18): 4880-4888.

6. Ionescu A, Zahavi EE, Gradus T, Ben-Yaakov K, Perlson E (2016) Compartmental microfluidic system for studying muscle–neuron communication and neuromuscular junction maintenance. *European journal of cell biology* 95(2): 69-88.

*Работа частично поддержана грантом РФФ № 17-15-01279.*

## **ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ РАЗНОСТИ ЭФФЕКТА ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК НА ДЛИНУ ТЕЛОМЕР**

Валеева Е.В., Кравцова О.А.

Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра биохимии и биотехнологии,  
Казанский Федеральный (Приволжский) университет  
vevaleeva@ya.ru, 89179172944

Эффект физических нагрузок на изменение длины теломер в последние годы интенсивно исследуются как на квалифицированных спортсменах, так и на активно занимающихся любителями спорта. При изучении данного вопроса наблюдается разность результатов. Первой причиной этого может быть в разности объекта исследования - разных типов клеток в работах (лейкоциты, эндотелиальные клетки, клетки скелетных мышц). Утверждается, что длину теломер лучше измерять в тканях, которые соответствуют измерению физической меры, например, в мышечных клетках [1].

Многие результаты исследований свидетельствуют о том, что, во-первых, разный тип физической нагрузки по-разному влияют на теломеры в молодом и в среднем возрасте, к примеру, силовая нагрузка положительно коррелирует с длиной теломер, и во-вторых, в пожилом возрасте можно обнаружить большую разницу в длине теломер у людей, тренирующихся с высокой физической нагрузкой на выносливость.

Второй причиной расхождения того, что высокая физическая активность не всегда положительно коррелирует с длиной теломер может быть потому, что в исследованиях не учитываются различия влияющих факторов (питание, стресс, образ жизни, вредные привычки, сон, принимаемые препараты и др.) и протоколов упражнений, в частности, периодичность, продолжительность нагрузки и тип физической активности. Существующие доказательства взаимосвязи спортивной нагрузки с психическим и физическим здоровьем предполагают, что умеренные и системные упражнения благоприятно влияют как в целом на организм человека, в частности и на длину теломер. Однако, как известно, профессиональная спортивная деятельность часто стрессогенна. Также обращают на себя внимание более поздние работы, в которых показано, что более энергетически затратная физическая нагрузка ассоциирована с длинными теломерами лейкоцитов и эндотелиальных клеток. Умеренная и системная физическая активность может быть более полезной для предотвращения укорочения теломер [2]. Если учитывать все дополнительные факторы, которые могут

повлиять на длину теломер и с которыми сталкиваются спортсмены при физических нагрузках, то данные эффекта нагрузки на длину теломер могут быть точнее.

Третья причина может быть в разности методах исследования (qPCR, саузерн- блоттинг, TRF анализ и т.д.).

И последняя причина, которую нужно учитывать – это порог устойчивости к воспринимаемому стрессу в виде физических нагрузок, который для каждого человека будет индивидуальным. На данный момент известно около 100 генетических маркеров, которые ассоциированы со стрессоустойчивостью. Так как генетически детерминированные признаки высшей нервной деятельности проявляются у людей по-разному и представляется важным выявление индивидуального набора антистрессовых защитных механизмов, ассоциированных с различными психическими качествами. Генетически детерминированный протективный механизм организма может выявляться в виде индивидуального высокого порога изнурительной физической нагрузки человека.

Таким образом, при изучении ассоциации длины теломер с физической активностью в большинстве работ демонстрируется, что разный тип физической нагрузки во многом благоприятно влияет на длину теломер. Однако различия в условиях, методах, протоколах проведения исследований длины теломер и индивидуальной генетической архитектуры человека также могут играть важную роль в разности выявления ассоциации длины теломер с физическими нагрузками. Возможно, что для дальнейших научных работ существует необходимость в более полном представлении метода для повторного воспроизведения в независимых исследованиях на людях, а также на животных моделях.

#### *Список литературы*

1. K.A. Mather, A.F. Jorm, R.A. Parslow, H. Christensen. Is telomere length a biomarker of aging? A review. Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences. 2010; 66(2): 202-213.

2. J.B. Ludlow, M. Ivanovic. Comparative dosimetry of dental CBCT devices and 64-slice CT for oral and maxillofacial radiology. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology. 2008; 106(1): 106-114.

*Работа поддержана грантом РФФИ № 19-34-90171.*

## **ТРАНСПОРТ $Ca^{2+}$ В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА В УСЛОВИЯХ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ДЮШЕННА**

*Дубинин М.В., Таланов Е.Ю., Старинец В.С., Теньков К.С., Белослудцев К.Н.*

ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет»

dubinin1989@gmail.com, 89877010437

**Введение.** Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) представляет собой наследственное X-сцепленное заболевание, вызванное мутациями в гене дистрофина, расположенного в локусе Xp21.2. Такие мутации приводят к тяжелому отсутствию (5%) дистрофина, белка мембраны мышечных клеток, который соединяет цитоскелет и внеклеточный матрикс в

мышечном волокне и обеспечивает его стабильность при сокращении. Хотя первичные клинические проявления МДД связаны со слабостью скелетных мышц, со временем вследствие вовлечения сердечной мышцы у больных наблюдается дилатационная кардиомиопатия, нарушение проводимости и аритмия [1]. Считается, что при этом заболевании наблюдаются значительные морфологические и функциональные изменения митохондрий, связанные с гиперпродукцией активных форм кислорода в митохондриях, снижением активности окислительного фосфорилирования, перекисным окислением мембранных липидов, открытием МТР поры [2]. До сих пор не известно, что же лежит в основе изменений в функционировании митохондрий при развитии мышечной дистрофии Дюшенна. В настоящей работе нами проведено сравнительное исследование функциональной активности митохондрий сердца дистрофин-дефицитных мышей линии C57BL/10ScSn-Dmdmdx (mdx мыши) и мышей C57BL/10 «дикого типа», использованных в качестве контрольных животных.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводили на митохондриях сердца указанных линий мышей, которые выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования. Транспорт ионов кальция оценивали с помощью  $\text{Ca}^{2+}$  индикатора арсеназо III. Количество субъединиц кальциевого унипортера (MCU, MCUb, MICU1, EMRE) и  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортера в митохондриях сердца определено методом western-blot. Экспрессия генов указанных белков оценена методом ОТ ПЦР в реальном времени.

**Результаты.** На первом этапе мы сравнили кинетические параметры транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях сердца дистрофин-дефицитных мышей и мышей «дикого типа». Мы оценили скорость поглощения  $\text{Ca}^{2+}$  посредством унипорта в митохондриях сердца двух групп животных. Кроме того, мы также измерили скорость выхода  $\text{Ca}^{2+}$  посредством механизма антипорта, реализуемого в присутствии  $\text{Na}^+$ . Как видно из данных рис 1, для митохондрий сердца mdx мышей, окисляющих глутамат/малат, характерно небольшое увеличение скорости  $\text{Ca}^{2+}$  унипорта по сравнению с животными «дикого типа» (рис. 1Б). Кроме того, можно видеть, что митохондрии сердца mdx мышей характеризуются увеличением скорости  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипорта, осуществляющего выход  $\text{Ca}^{2+}$  из матрикса митохондрий в обмен на  $\text{Na}^+$ , по сравнению с контрольными животными (рис. 1В).

Известно, что поглощение  $\text{Ca}^{2+}$  митохондриями осуществляется посредством  $\text{Ca}^{2+}$  унипортера, который представляет собой комплекс белков внутренней мембраны органелл, включающий в себя канальные субъединицы – MCU и MCUb и регуляторные субъединицы – MICU1-2, EMRE, MCUR1 и ряд других белков. Предполагается, что кинетика  $\text{Ca}^{2+}$  транспорта определяется соотношением в митохондриях канальных субъединиц MCU и MCUb и регуляторной субъединицы MICU1. Вследствие того, что митохондрии сердца mdx мышей характеризуются увеличением скорости  $\text{Ca}^{2+}$  унипорта по сравнению с мышами дикого типа, можно предположить, что при развитии МДД происходит изменение количества данных субъединиц унипортера в митохондриях сердца.

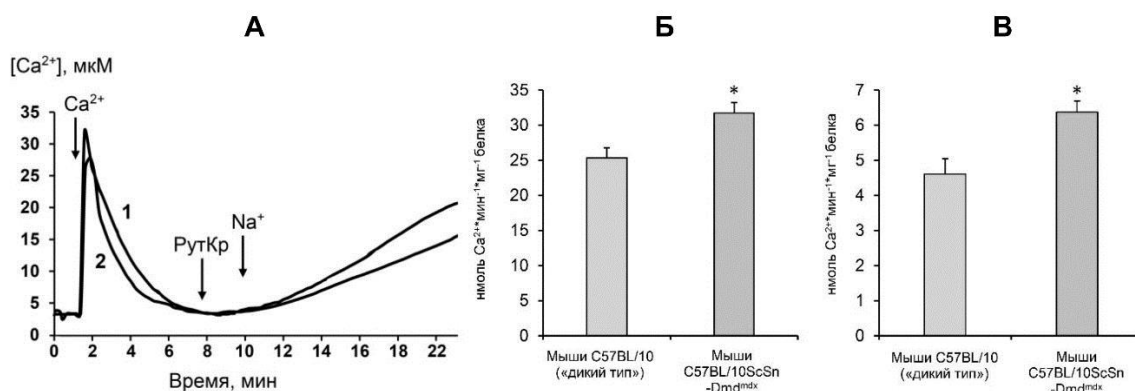


Рис. 1. Кинетика транспорта  $Ca^{2+}$  (А) в митохондриях сердца мышей «дикого типа» (кривая 1) и mdx мышей (кривая 2). Сравнение скорости поглощения (Б) и выброса  $Ca^{2+}$  митохондриями сердца мышей «дикого типа» и mdx мышей. Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n=4$ ). \*Разница между контролем (показатели мышей «дикого типа») и экспериментом (показатели mdx мышей) является статистически значимой ( $p < 0.05$ ).

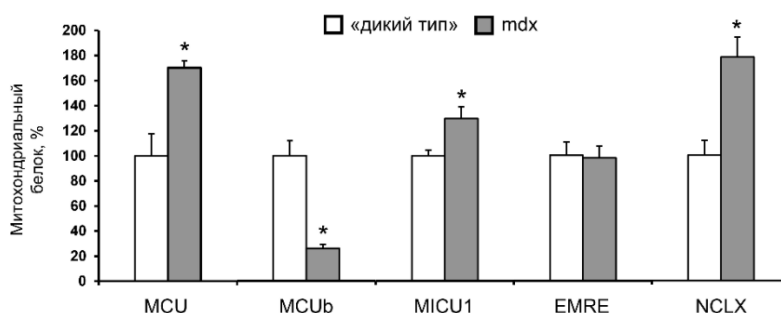


Рис. 2. Относительное количество белков-субъединиц кальциевого унипортера: MCU, MCUb, MICU1, EMRE, а также  $Na^{+}/Ca^{2+}$ -антипортера в мышцах сердца мышей «дикого типа» и mdx мышей. Уровень сигнала вестерн-блота в мышцах сердца мышей «дикого типа» принят за 100%. Приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n=3$ ). \*Разница между контролем (уровень белка в митохондриях мышей «дикого типа») и экспериментом (уровень белка у mdx мышей) является статистически значимой ( $p < 0.05$ ).

На рис. 2 представлены данные вестерн-блотинга белков-компонентов комплекса кальциевого унипортера митохондрий, изолированных из скелетных мышц mdx мышей, а также животных «дикого типа». Можно видеть, что для дистрофин-дефицитных животных характерно увеличение количества канальной субъединицы кальциевого унипортера MCU по сравнению с животными «дикого типа». При этом в митохондриях mdx мышей наблюдается значительное снижение уровня доминант-негативной субъединицы MCUb. Также в тканях сердца mdx мышей происходило увеличение количества регуляторной субъединицы MICU1, составляющей «воротный» механизм унипортера. Количество регуляторной субъединицы EMRE не изменялось. Кроме того, стоит отметить, что для тканей сердца дистрофин-дефицитных животных характерно увеличение количества белка  $Na^{+}/Ca^{2+}$ -антипортера (NCLX). Стоит отметить, что результаты ОТ ПЦР в реальном времени подтверждают полученные данные (не показано), что свидетельствует о регуляции экспрессии генов исследуемых белков на уровне транскрипции. Исключение в этом случае составляет субъединица MCUb унипортера, для которой не было выявлено различий в экспрессии гена между экспериментальными животными (не показано).

**Обсуждение.** Ранее в ряде работ было показано наличие механизмов гипер-регенерации, имеющей место у мышей mdx молодого возраста, которая, как предполагается, маскирует ранние нарушения биоэнергетики кардиомиоцитов при развитии мышечной дистрофии Дюшенна [3]. При этом в ряде работ установлено, что митохондрии сердца молодых mdx мышей не отличаются от митохондрий мышей дикого типа по показателям дыхания и генерации  $H_2O_2$  [4]. Можно полагать, что адаптация кардиомиоцитов mdx животных к развитию МДД в молодом возрасте может быть обусловлена, в том числе, более высокой эффективностью транспорта ионов кальция в митохондриях сердца. Наблюдаемое нами увеличение скорости поглощения ионов  $Ca^{2+}$  митохондриями сердца mdx мышей, по всей видимости, опосредовано существенным уменьшением количества доминант-негативной субъединицы MCUb в составе кальциевого унипортера органелл. Кроме того, увеличение скорости унипорта в митохондриях сердца mdx мышей может быть связано с увеличением количества канальной субъединицы MCU и регуляторной субъединицы MICU1. Также стоит подчеркнуть увеличение уровня белка  $Na^+/Ca^{2+}$ -антипортера в митохондриях сердца mdx мышей, что приводит к увеличению скорости выброса  $Ca^{2+}$  из органелл.

**Заключение.** Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что при развитии МДД в митохондриях сердца происходят генетически запрограммированные структурные и функциональные перестройки систем, ответственных за регуляцию митохондриального  $Ca^{2+}$  гомеостаза ( $Ca^{2+}$  унипортер, NCLX). Такие перестройки могут приводить к существенному увеличению эффективности регуляции гомеостаза  $Ca^{2+}$  в митохондриях сердца при МДД и, предположительно, способствовать адаптации кардиомиоцитов к условиям патологии.

#### *Список литературы*

1. G. Nigro, L.I. Comi, F.M. Limongelli, M.A. Giugliano, L. Politano, V. Petretta, L. Passamano, S. Stefanelli. Prospective study of X-linked progressive muscular dystrophy in Campania. *Muscle Nerve*. 1983; 6: 253-262.
2. M. Kelly-Worden, E. Thomas. Mitochondrial dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Open J. Endocr. Metab. Dis*. 2014; 4: 211-218.
3. J.W. McGreevy, C.H. Hakim, M.A. McIntosh, D. Duan. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis. Model. Mech*. 2015; 8:195-213.
4. Y. Burelle, M. Khairallah, A. Ascah, B.G. Allen, C.F. Deschepper, B.J. Petrof, C. Des Rosiers. Alterations in mitochondrial function as a harbinger of cardiomyopathy: lessons from the dystrophic heart. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2010; 48: 310-321.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ в рамках научного проекта № 18-75-00011.*

## ИЗМЕНЕНИЯ КОНТРАКЦИИ СГУСТКОВ КРОВИ У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

*Н. Г. Евтюгина<sup>1</sup>, А. Д. Пешкова<sup>1</sup>, С.И. Сафиуллина<sup>2</sup>, Р. И. Литвинов<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>НИЛ «Белково-клеточные взаимодействия», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

<sup>2</sup>ООО Медицинский центр «Айболит», г. Казань

[natalja.evtugyna@gmail.com](mailto:natalja.evtugyna@gmail.com)

**Введение.** Врожденные и приобретенные нарушения гемостаза являются одним из патогенетических факторов привычного невынашивания беременности (ПНБ), изучение которого важно для прогноза и профилактики акушерской патологии. Одной из наименее изученных реакций свертывания крови и тромбообразования, в том числе при акушерской патологии, является процесс спонтанного сжатия (контракции, ретракции) сгустка крови под действием активированных тромбоцитов.

**Материалы и методы.** Для изучения кинетики контракции сгустков крови *in vitro* мы разработали новый аппаратный метод, который позволяет определить кинетические параметры сжатия сгустка (лаг-период, степень и скорость), образованного в цельной цитратной крови под действием тромбина в присутствии ионов кальция. Размер сгустка фиксировали фотографически каждые 15 секунд в течение 20 минут с последующей компьютерной обработкой кинетических кривых контракции. В данной работе исследовали кровь 50 женщин с ПНБ в анамнезе в сравнении с 30 рожавшими женщинами безотягощенного акушерского анамнеза на этапе планирования беременности.

**Результаты.** Нами обнаружено достоверное угнетение контракции сгустков крови у пациенток с историей ПНБ по сравнению с контрольной группой. Об этом свидетельствуют достоверное торможение всех стадий контракции: снижение средней степени (с  $43\pm 1\%$  до  $35\pm 1\%$ ,  $p < 0,001$ ) и средней скорости контракции (с  $0,034\pm 0,001$  %/сек до  $0,028\pm 0,001$  %/сек,  $p < 0,001$ ), а также удлинение лаг-периода (с  $253\pm 17$  сек. до  $196\pm 14$  сек.,  $p < 0,05$ ) у пациенток с ПНБ и здоровых доноров, соответственно.

**Обсуждение.** Угнетение контракции сгустков крови может говорить о дисфункции тромбоцитов у пациенток с ПНБ вследствие хронической гиперактивации клеток на фоне гиперкоагуляции и тромбинемии.

**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о важной роли нарушений гемостаза в патогенезе невынашивания беременности. Кроме того, полученные данные указывают на возможность использования результатов теста кинетики контракции сгустков крови в качестве прогностического критерия риска спонтанного прерывания беременности.

Работа выполнена по Программе повышения конкурентоспособности КФУ и гранта 18-415-160004 РФФИ и РТ.

# БИОТЕСТИРОВАНИЕ ПРОФИЛЯ ЦИТОКИН-ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ИММУНОКОМПРОМЕНТАЦИИ В ОТВЕТ НА ДЕЙСТВИЕ МИТОГЕННОГО ФАКТОРА

*Казарян Г.Г.<sup>1,2</sup>, Валеева А.Р.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования

Минздрава России (филиал Казанская государственная медицинская академия), г. Казань,

Россия

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет

[gevorg.kazarian@mail.ru](mailto:gevorg.kazarian@mail.ru)

**Введение.** При иммунокомпроментированных состояниях зачастую наблюдается снижение активности CD-4 клеток, ответственных за продукцию цитокинов. В связи с этим, оценка уровня субпопуляции лимфоцитов, ответственных за выработку IFN- $\gamma$  и IL-2, является одной из задач биомедицинских исследований [1,2]. Целью данной работы была оценка профиля цитокин-продуцирующей субпопуляции лимфоцитов при иммунокомпроментации методом биотестирования в ответ на действие фитогемагглютинина (ФГА).

**Материалы и методы.** Материалом для исследования служили пробы крови 42 ВИЧ-инфицированных пациентов. От всех участников исследования было получено добровольное информированное согласие. Исследование проводилось с разрешения Локального этического комитета КГМА. Образцы цельной крови были взяты в пробирку с гепарином, с последующим переносом по 1 мл в пробирки с ФГА и без ФГА. Пробы инкубировали в течение 16-24 часов при температуре 37°C. Супернатант переносили в микропробирки и хранили при -20°C. Затем пробы размораживали и методом ИФА определяли оптическую плотность в образцах для оценки уровня синтезированных цитокинов IFN- $\gamma$  и IL-2 согласно инструкции производителя (Lionex GmbH).

**Результаты.** В ходе исследования было выявлено, что уровень самопроизвольной выработки цитокина IFN- $\gamma$  лимфоцитами был ниже 0,500 OD. Только в одном случае наблюдалось его превышение (рис. 1). Под действием ФГА активность IFN- $\gamma$ -продуцирующих клеток была низкой у 38,1% исследуемых лиц, средняя – у 40,5%, и высокая – у 21,4%. В среднем во всей группе иммунокомпроментированных лиц при стимуляции митогеном ФГА уровень IFN- $\gamma$  был в 7,5 раз выше, чем без стимуляции.

Уровень самопроизвольной выработки цитокина IL-2 лимфоцитами был также в большинстве случаев ниже 0,500 OD. Только у четырех пациентов наблюдалось его превышение (рис. 2). Под действием ФГА активность IL-2-продуцирующих клеток была низкой у 40,5% исследуемых лиц, средняя – у 21,4%, и высокая – у 38,1%. В среднем во всей исследуемой группе при стимуляции митогеном ФГА уровень IL-2 был в 7,4 раз выше, чем без стимуляции.

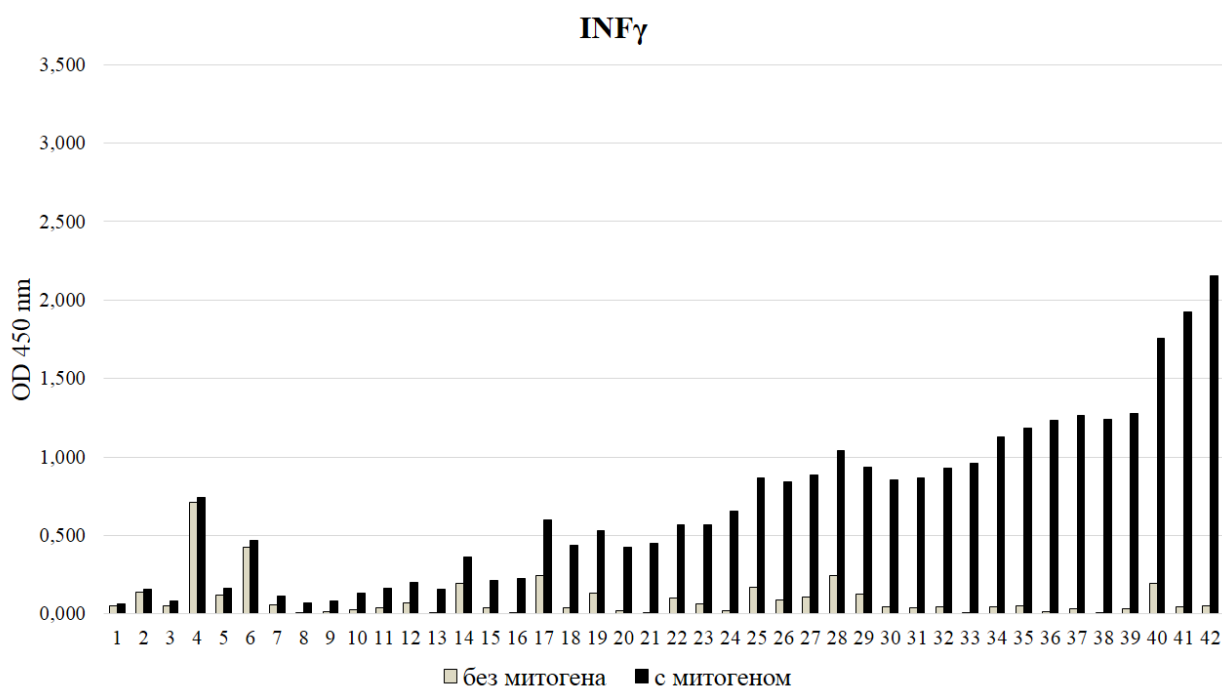


Рис. 1. Уровень IFN- $\gamma$  в плазме крови после инкубации с ФГА и без митогена (результаты ИФА)

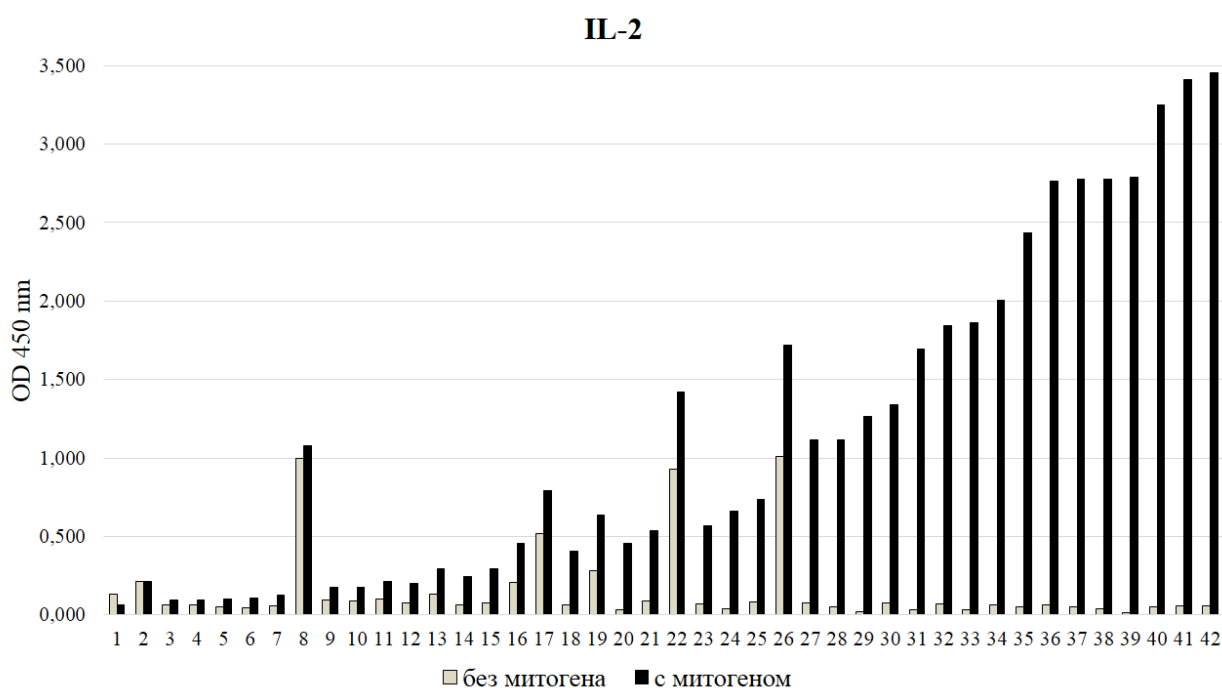


Рис. 2. Уровень IL-2 в плазме крови после инкубации с ФГА и без митогена (результаты ИФА)

**Обсуждение.** Исследования показали, что митоген ФГА обладает выраженным иммуностимулирующим действием, что выражается в повышении активности синтеза цитокинов IFN- $\gamma$  и IL-2 лимфоцитами. Особенно важно отметить, что данные исследования проводились на фоне иммунокомпроментации. Наблюдаемая относительно невысокая активность лимфоцитов в ответ на действие митогена можно объяснить особенностью патогенеза ВИЧ-инфекции, что приводит к иммунодепрессии Т-клеточного звена



иммунитета. Аналогичные результаты были получены при биотестировании указанных цитокинов методом иммуноферментных пятен (ELISPOT) [3,4].

**Заключение.** Биотестирование цитокинов в ответ на действие фитогемагглютинаина является эффективным способом оценки профиля цитокин-продуцирующей субпопуляции лимфоцитов, что особенно эффективно при исследовании иммунокомпроментированных лиц. Сравнительный анализ уровня продукции IFN- $\gamma$  и IL-2 при биотестировании позволяет шире оценить иммунный статус в общем комплексе клинико-лабораторных исследований.

#### *Список литературы*

1. L. Gorenec, S. Zidovec Lepej, I. Grgic, A. Planinic, J. Iscic Bes, A. Vince, J. Begovac. The comparison of Th1, Th2, Th9, Th17 and Th22 cytokine profiles in acute and chronic HIV-1 infection. *Microb Pathog.* 2016; 97: 125-130.

2. L. Pastor, E. Parker, J. Carrillo, V. Urrea, L. Fuente-Soro, D. Respeito, C. Jairoce, I. Mandomando, J. Blanco, D. Nanche. A cytokine pattern that differentiates preseroconversion from postseroconversion phases of primary HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2017; 74(4): 459-466.

3. C. Della Bella, M. Spinicci, A. Grassi, F. Bartalesi, M. Benagiano, K. Truthmann, S. Tapinassi, A. Troilo, S. D'Elis, H. Alnweisri, E. Shuralev, M. Singh, A. Bartoloni, M.M. D'Elis. Novel M. tuberculosis specific IL-2 ELISpot assay discriminates adult patients with active or latent tuberculosis. *PLoS One.* 2018; 13(6): e0197825.

4. А.С. Юдина, А.Р. Валеева, Э.А. Шуралев. Биотестирование цитокинов при оценке клеточного иммунного ответа на микобактериальные антигены методом ELISPOT. *Инновационная наука.* 2018; 3: 14-21.

## **ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНКИНАЗ НА ДИНАМИКУ ПЕРВИЧНОЙ РЕСНИЧКИ**

*Киселева А.А.<sup>1,2</sup>, Никонова А.С.<sup>2</sup>, Абрамова З.И.<sup>1</sup>, Големис Э.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> – Казанский (Приволжский) Федеральный Университет

<sup>2</sup> – Раковый центр Фокс Чейз

[Anna.Kiseleva@fcc.edu](mailto:Anna.Kiseleva@fcc.edu) , +7(906) 327-7556)

**Введение.** Первичная ресничка (или цилия) – это антенноподобная органелла на поверхности клеток, которая представляет собой платформу для рецепторов, активирующих такие сигнальные пути, как Hedgehog, WNT, а также сигнальный каскад рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGF $\alpha$ ) [1]. Цилии крайне динамичны, и одной из их основных отличительных характеристик является способность подвергаться циклической сборке и разборке в зависимости от стадии клеточного цикла. В нормальных условиях цилия начинает формироваться, когда клетки входят в стадию митотического покоя (G0), и разбирается непосредственно перед делением клетки [2]. Мутации генов, кодирующих цилиарные белки, приводят к развитию тяжелых пороков развития, известных под общим термином цилиопатии, самым распространенным из которых является аутосомно-доминантный поликистоз почек (АДПКД). Также стоит отметить, что большинство типов рака утрачивают способность к формированию реснички, вызывая асимметрию передачи сигналов в микроокружении опухоли. Из-за тесной взаимосвязи цилии, клеточного цикла и

раковых заболеваний, было показано, что некоторые белки, связанные с пролиферацией и онкотрансформацией клеток, также являются важными регуляторами цилиогенеза [3]. Примечательно, что некоторые из этих белков представляют собой киназы и являются «классическими» мишенями для противоопухолевой терапии. Характерным примером такого белка является митотическая киназа Аврора А, активность которой крайне важна при созревании центросом и формировании митотического веретена деления, но при этом также является инициатором разборки ресничек в фазе G0. Избыточная экспрессия Авроры А наблюдается во многих типах опухолей, и, таким образом, существуют препараты для селективного ингибирования данной киназы, например, противоопухолевый препарат алисертиб. Было показано, что обработка клеток алисертибом стабилизирует реснички, а лечение данным препаратом мышей с АДПКД существенно ухудшает прогрессирование заболевания [4]. На основании полученных данных целью данной работы является идентификация ряда других препаратов, изначально разработанных для ингибирования белков, имеющих отношение к раку, которые могут влиять на динамику ресничек и потенциально изменять фенотип цилиопатий (например, АДПКД), а также передачу сигналов через цилия-ассоциированные сигнальные каскады.

**Материалы и методы.** Для того, чтобы выявить ингибиторы протеинкиназ, которые могут оказывать влияние на динамику первичной реснички, мы проанализировали библиотеку из 180 препаратов с известной специфичностью действия. В качестве модели для тестирования ингибиторов мы сгенерировали клеточную линию на основе эпителиальных клеток сетчатки глаза человека (hTERT-RPE1) со стабильной экспрессией флуоресцентно-меченного цилиарного белка Arl13b-GFP, после чего произвели высоко-производительный скрининг ингибиторов киназ.

**Результаты.** В результате скрининга мы выявили 5 ингибиторов, стимулирующих разборку реснички (например, сунитиниб), и 6 ингибиторов стабилизирующих ресничку (например, эрлотиниб и ингибитор IRAK1/4), большинство из которых никогда ранее не были исследованы в контексте регулирования цилиогенеза. Мы подтвердили специфичность каждого ингибитора в отношении влияния на динамику ресничек с помощью мРНК, а также продемонстрировали, что для ряда ингибиторов изменение динамики цилии было связано с контролем активности Авроры А. Важно отметить, что для ряда соединений, например для сунитиниба, была выявлена способность влиять на цилия-ассоциированную передачу сигналов по типу Hedgehog, основанную на механизме ингибирования транслокации рецептора Smoothed в первичную ресничку. *In vivo*, в мышинной модели АДПКД, сунитиниб также показал положительный и противоположный алисертибу эффект: лечение препаратом приводит к дестабилизации реснички в почечном эпителии и уменьшает образование почечных кист.

Мы также более детально исследовали эффект на стабилизацию цилий при обработке ингибитором IRAK4 – киназы, которая является важнейшим медиатором активации сигнального каскада врожденного иммунного ответа, и никогда ранее не была ассоциирована с первичной ресничкой. Мы определили, что, помимо IRAK4, ингибирование некоторых белков-участников данного сигнального пути, например убиквитиназы Pellino 1, также приводит к стабилизации реснички, что является доказательством важности данного сигнального пути в контексте первичной реснички, и требует дальнейшего исследования.

**Обсуждение.** Полученные в ходе данного исследования данные демонстрируют, что ряд лекарств, используемых для лечения раковых пациентов или находящихся в разработке для

терапии рака, могут оказывать влияние на динамику цилии и, таким образом, изменять течение цилия-ассоциированных заболеваний, например АДПКД. Таким образом, данная работа частично направлена на решение проблемы селективности используемых препаратов, а также проблемы неизученных побочных эффектов той или иной терапии, в контексте наших исследований – на примере влияния на первичную ресничку при АДПКД.

**Выводы.** Впервые было установлено, что некоторые противоопухолевые препараты, включая идентифицированные нами сунитиниб и ингибитор IRAK1/4, могут регулировать динамику ПР, при этом мы также выявили, что выбранные ингибиторы оказывают влияние на Hedgehog сигнальный каскад. Примечательно, что сунитиниб также эффективен *in vivo*: лечение препаратом существенно сокращает прогрессирование АДПКД. В заключении, было продемонстрировано, что ингибирование некоторых белков врожденного иммунного ответа стабилизирует цилии.

**Заключение.** Результаты данной работы вносят вклад в понимание того, как некоторые лекарственные средства с уже известным механизмом действия и широко применяемые в клинической практике, могут оказывать неожиданные побочные эффекты, в частности, посредством влияния на первичную ресничку как важную физическую платформу для передачи межклеточных сигналов.

#### Список литературы

1. G. Wheway, L. Nazlamova, J.T. Hancock. Signaling through the primary cilium. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2018; 6: 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2018.00008/full>
2. I. Sánchez, B.D Dynlacht. Cilium assembly and disassembly. *Nature Cell Biology*. 2016 Jun 28; 18(7): 711-7.
3. H. Liu, A.A. Kiseleva, E.A. Golemis. Ciliary signalling in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2018 Aug; 18(8): 511-524.
4. A.S. Nikonova, O.V. Plotnikova, V. Serzhanova, A. Efimov, I. Bogush, K.Q. Cai, H.H. Hensley, B.L. Egleston, A. Klein-Szanto, T. Seeger-Nukpezah, E.A. Golemis. Nedd9 restrains renal cystogenesis in Pkd1<sup>-/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Sep 2; 111(35): 12859-64.
5. A.A. Kiseleva, V.A. Korobeynikov, A.S. Nikonova, P. Zhang, P. Makhov, A.Y. Deneka, M.B. Einarson, I.G. Serebriiskii, H. Liu, J.R. Peterson, E.A. Golemis. Unexpected Activities in Regulating Ciliation Contribute to Off-target Effects of Targeted Drugs. *Clin Cancer Res*. 2019 Jul 1; 25(13): 4179-4193.

#### АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПАЦИЕНТОВ С ОГРАНИЧЕННЫМИ ВОЗМОЖНОСТЯМИ

Коровина М.О.<sup>1</sup>, Сафина Н.А.<sup>1,2</sup>, Абдрашитова А.Б.<sup>2</sup>, Гайнуллина Д.К.<sup>2</sup>, Запарина С.В.<sup>2</sup>

1 – КГМА - филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Казань, Россия.

2 - ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, Казань, Россия.

[koporulina.mo@gmail.com](mailto:koporulina.mo@gmail.com), 89179187285

**Введение.** В последние годы предпринимаются попытки использовать определение протеолитических ферментов ротовой жидкости в качестве ранних биомаркеров развития

стоматологических заболеваний, оценки тяжести процесса и адекватности проводимой терапии. [1]

Это имеет особенно важное значение для людей с ограниченными возможностями, поскольку санация рта у этих пациентов представляет определённые трудности для врача-стоматолога из-за отсутствия адекватного проведения индивидуальной гигиены рта. [2,3]

Целью работы являлось изучение уровня протеолитических ферментов, их распределение по молекулярным массам и типу активных центров в ротовой жидкости у пациентов с ограниченными возможностями и отягощенным стоматологическим статусом.

**Материалы и методы.** Материалом для исследований служила ротовая жидкость пациентов с ограниченными возможностями и отягощенным стоматологическим статусом, а также ротовая жидкость здоровых добровольцев.

Работа проводилась совместно с кафедрой стоматологии детского возраста КГМУ (доц. Абдрашитова А.Б.). Определение активности протеиназ с различными типами активных центров проводились на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории КГМА.

В исследовании принимали участие 2 группы пациентов. I группа – пациенты с ограниченными возможностями и отягощенным стоматологическим статусом (N=30, возраст пациентов 15-25 лет). Стоматологический статус пациентов I группы характеризовался острой степенью активности кариозного процесса (индекс КПУ>9). II группа – здоровые добровольцы с интактным стоматологическим статусом аналогичного возраста (N=10).

Для определения спектра протеолитических ферментов, их активности и распределения по молекулярным массам проводился электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) с добавлением в качестве субстрата 2% желатина. Тип активных центров определяли с помощью ингибиторов – Na<sub>2</sub> ЭДТА (хелатор тяжелых металлов) и СИТ (соевый ингибитор трипсина). Таким образом, тест проводился в трех вариантах: без ингибиторов, а также в присутствии динатриевой соли ЭДТА и ингибитора сериновых протеиназ.

**Результаты.** При анализе общей активности протеолитических ферментов ротовой жидкости было показано, что у пациентов этот параметр был значительно и достоверно выше (15,49±2,48 PU /мкг белка), чем у добровольцев контрольной группы (6,211±1,18 PU / мкг белка).

У здоровых добровольцев в ротовой жидкости были обнаружены ферменты только с молекулярными массами 250, 160 и 130 кДа. У большей части пациентов протеолитические ферменты имели молекулярные массы приблизительно от 30 до 250 кДа. Все эти ферменты блокировались в присутствии ЭДТА, и соответственно принадлежали к металл-зависимым ферментам.

У 11 больных протеолитические ферменты были представлены только одной полосой просветления с молекулярной массой приблизительно 25-30 кДа, эти ферменты не блокировались ЭДТА, но ингибировались в присутствии соевого ингибитора, т.е. принадлежали к сериновым протеиназам.

Ферменты с молекулярной массой 250, 160 и 130 кДа встречались практически одинаково как у больных, так и у здоровых. (в 100% и 90 % случаев). Более низкомолекулярные – от 23 до 75 кДа встречались, в основном, в группе пациентов с отягощенным стоматологическим статусом.

Активность протеиназ с молекулярными массами 250, 160 и 130 кДа была значительно и достоверно выше у больных, чем в контрольной группе.

**Обсуждение.** В наших исследованиях было показано, что средний уровень белка в группе пациентов не отличался от такового в группе здоровых добровольцев, однако характеризовался значительной вариабельностью: если диапазон изменений в группе здоровых был от 40 до 80 мкг\мл, то в группе больных у части больных он достигал 180 мкг\мл. У некоторых пациентов уровень белка был значительно ниже (до 20 мкг\мл).

С чем связано такое различие между группами объяснить пока не представляется возможным, поскольку по основному заболеванию, по применяемой терапии, так и по возрасту эти больные различались между собой. В дальнейшем этот показатель использовали для расчета активности ферментов на количество белка в каждой пробе.

Также нами было показано, что в контрольной группе определялись протеазы только с молекулярными массами 250, 220 и 160 кДа, а у части пациентов имелся более разнообразный спектр ферментов как по молекулярным массам, так и по типу активных центров. Так, у 20% больных определялись ферменты с молекулярными массами 75 и 32 кДа, активность которых блокировалась в присутствии ЭДТА, т.е. они принадлежали к металл-зависимым ферментам. У 30% пациентов определялись протеиназы с молекулярной массой 40 кДа, которые также относились к металл-зависимым ферментам, поскольку ингибировались в присутствии ЭДТА.

У 36% пациентов проявлялась в ротовой жидкости активность сериновых протеиназ с молекулярной массой приблизительно 26 кДа.

Эти ферменты, конечно, нуждаются в идентификации, однако, их электрофоретические характеристики и тип активных центров позволяет нам предположить, что фермент с молекулярной массой 75 кДа может быть MMP-8 или MMP-2. Ферменты с молекулярной массой 48 кДа - могут быть MMP-13, MMP-3, MMP-10, MMP-11.

Повышенное содержание ферментов, которые с одинаковой частотой встречаются как у больных, так и у здоровых (250, 160 и 130 кДа), свидетельствует о том, что высокая протеолитическая активность ротовой жидкости пациентов обусловлена не только более разнообразным спектром протеиназ, но и повышением активности тех, которые одинаково встречались как у больных, так и у здоровых.

Обнаруженную нами разницу как по активности, так и спектру протеиназ ротовой жидкости у больных по сравнению со здоровыми можно объяснить их участием в воспалительном процессе. Источниками этих ферментов могут быть резидентные клетки (фибробласты, эпителиальные и эндотелиальные клетки), рекрутированные в область воспаления нейтрофилы, макрофаги, а также представители микробиоты ротовой полости.

**Заключение.** Протеолитические ферменты ротовой жидкости могут быть использованы в качестве ранних биомаркеров воспалительных заболеваний ротовой полости. Повышение активности отдельных протеиназ может служить дополнительным диагностическим маркером развития пародонтита, интенсивности кариозного процесса и, возможно, других воспалительных заболеваний рта.

Высокая активность и более разнообразный спектр протеолитических ферментов ротовой жидкости у пациентов с отягощенным стоматологическим статусом, а также знание типа активного центра, позволяют рассматривать их в качестве фармакологических мишеней при лечении и профилактике стоматологических заболеваний с использованием соответствующих ингибиторов.

#### *Список литературы*

1. J.S.Kinney, T.Morelli, M.Oh, T.M. Braun, C.A. Ramseier, J.V. Sugai, W.V. Giannobile. Crevicular fluid biomarkers and periodontal disease progression. *Journal of Clinical Periodontology*. 2014;2;113-120.
2. M. Diéguez-Pérez, M.J. de Nova-García, M.R. Mourelle-Martínez, B. Bartolomé-Villar. Oral health in children with physical (Cerebral Palsy) and intellectual (Down Syndrome) disabilities: Systematic review I. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. 2016; 3; 337-343.
3. R.N.Moreira, C.E. Alcântara, I. Mota-Veloso, S.A.Marinho, M.L.Ramos-Jorge, F. Oliveira-Ferreira. Does intellectual disability affect the development of dental caries in patients with cerebral palsy? *Research in Developmental Disabilities*. 2012;5;1503-1507.

## ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ЭКТО-НУКЛЕОТИДАЗ КЛЕТОК КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРТОНИЧЕСКИМ КРИЗОМ

Мансур Ула Мухаммед, Казакова Рената Рувшановна

Научно-образовательный центр фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета

e-mail: [rrkazakova@kpfu.ru](mailto:rrkazakova@kpfu.ru), телефон: +7(927) 407-10-56

**Введение.** P2-рецепторы, основным эндогенным агонистом которых является аденозинтрифосфорная кислота (АТФ), распространены во всех органах и тканях млекопитающих. Установлено, что АТФ может влиять на тонус сосудов нейрональным (суживая) и эндотелиальным путем (расширяя). Помимо эффекта опосредованного АТФ, следует учитывать действие на P2-рецепторы аденозиндифосфата (АДФ), аденозинмонофосфата (АМФ) и аденозина - продуктов расщепления АТФ экто-нуклеотидазами. Состояние пуринергической системы при гипертензии остается малоизученным как у животных, так и у человека, имеются данные, что у мышей с гипертензией, происходит снижение экспрессии и активности Е-NTPДазы 1 типа [1]. Поскольку баланс синтеза и потребления АТФ в сыворотке определяет длительность и величину пуринергической сигнализации в крови, а следовательно сосудистого тонуса, представляется интересным исследовать активность экто-нуклеотидаз клеток крови.

**Материалы и методы.** Кровь пациентов с гипертоническим кризом получали в Университетской клинике Казанского Федерального Университета, донорскую кровь отбирали у здоровых добровольцев. На проведение экспериментов получено разрешение этического комитета ФГОУ ВО «Казанского (Приволжского) федерального университета». Кровь отбирали в вакутейнеры с цитратом, затем на градиенте плотности полиморфпреп (Alere Technologies AS, Norway) при центрифугировании выделяли мононуклеары (МНК) – лимфоциты и моноциты, а также полиморфонуклеары (ПМН) – нейтрофилы, базофилы и гранулоциты [2]. Определение активности экто-нуклеотидаз проводили колориметрическим методом с помощью малахитового зеленого. Метод позволяет определить количество фосфата, образующегося в результате ферментативного разложения внеклеточной АТФ на многофункциональном микропланшетном ридере Tecan Infinite M200 Pro ("Tecan Austria GmbH", Австрия).

**Результаты.** Нами выявлено, что после добавления 500  $\mu$ М АТФ к МНК и ПМН здоровых добровольцев происходило зависимое от времени увеличение количества свободного фосфата, свидетельствующее об активности мембранных экто-нуклеотидаз, расщепляющих АТФ (Рис. 1). Добавление 500  $\mu$ М АТФ к МНК и ПМН пациентов с гипертоническим кризом не приводило к увеличению количества фосфатов, что говорит о значительном снижении активности экто-нуклеотидаз.

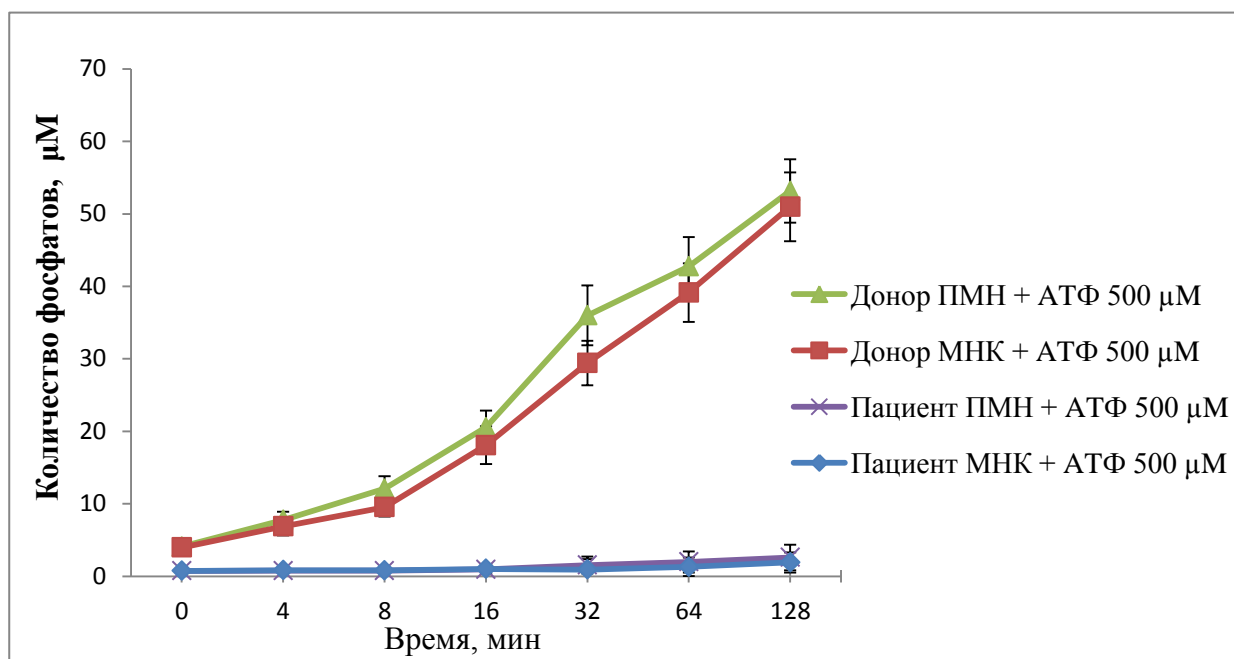


Рисунок 1 – Измерение активности экто-нуклеотидаз (Mean±SED) клеток крови здоровых добровольцев (n=7) и пациентов (n=3) с гипертоническим кризом

**Обсуждение.** Наши результаты подтверждают работу Jalkanen [3], который описал тенденцию к повышению уровня АДФ в сыворотке пациентов с гипертонией, предположительно связав это со снижением количества E-NTPДазы 1 типа (CD39) [3]. Известно, что E-NTPДазы 1 типа (CD39) расположены на эндотелии, на >90 % В клеток, >90 % моноцитов и др. клетках крови и расщепляют АТФ до АДФ и АМФ. Экто-5'-нуклеотидазы (CD73) экспрессируются на эндотелии, > 75% В клеток, 50 % CD8<sup>+</sup> Т клеток и др. клетках крови и расщепляют АМФ до аденозина. Представляется интересным узнать, какой тип экто-нуклеотидаз снижает активность у пациентов с гипертонической болезнью.

**Заключение.** Исследование активности экто-нуклеотидаз требует дальнейшего изучения, поскольку вероятно, что привнесение активности экто-нуклеотидаз извне может помочь в профилактике повышения артериального давления, также они могут быть новыми альтернативными мишенями воздействия препаратов для снижения давления.

#### Список литературы

1. Ch.Roy, J.Tabiasco, A. Caillon, Y. Delneste, J. Merot, J. Favre, A. Laure Guihot, L. Martin, D.C. Nascimento, B. Ryffel, S.C. Robson, J. Sévigny, D.Henrion, G. Kauffenstein. Loss of vascular expression of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/CD39 in hypertension. *Purinergic Signalling* 2018; 14:73–82.
2. L.M. Montaña, M.H. Vargas, M. De Ita-Ley, Díaz-Hernández V., R. Kazakova, C Barajas-López. Decreased expression of ectonucleotidase E-NPP1 in leukocytes from subjects with severe asthma exacerbation. *Allergy*. 2016; 71 (1): 124-128.
3. Jalkanen J, Yegutkin GG, Hollmén M, Aalto K, Kiviniemi T, Salomaa V, Jalkanen S, Hakovirta H. Aberrant circulating levels of purinergic signaling markers are associated with several key aspects of peripheral atherosclerosis and thrombosis. 2015 Mar 27;116(7):1206-15.

*Выражаем огромную благодарность Валиуллиной Рамзие Мударисовне врачу Университетской клиники КФУ за помощь в заборе крови у пациентов с гипертонической болезнью.*

# FPR1 И FPR2 ОПОСРЕДОВАННАЯ ГЕНЕРАЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ФАГОЦИТАМИ ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

*Мохаммад Афраа*<sup>1</sup>, *Филина Ю.В.*<sup>1</sup>, *Арлеевская М.И.*<sup>2</sup>, *Габдулхакова А.Г.*<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>2</sup> ЦНИЛ КГМА, Казань, Россия

[afraamhmad@gmail.com](mailto:afraamhmad@gmail.com) тел. +79656274931

**Введение.** Рецепторы формилированных пептидов 1 и 2 (FPR1 и FPR2) главным образом экспрессируются фагоцитами, и их активация различными агонистами вызывает каскад сигнальных событий, приводящих к хемотаксису, продукции активных форм кислорода (АФК), секреторной дегрануляции и транскрипции генов [1]. Активированный рецептор FPR2 проявляет про- и противовоспалительное действие, обеспечивая регуляцию воспалительного процесса [2]. Целью данной работы было проведение сравнительного анализа между здоровыми донорами и пациентами с ревматоидным артритом (РА) и системным склеродермией (ССД) путем оценки спонтанной и опосредованной FPR1 и FPR2 оксидазной активности моноцитов и гранулоцитов периферической крови наряду с уровнем экспрессии FPR1.

**Материалы и методы.** Образцы периферической крови отбирали у пациенток с РА (разные стадии), их родственников и пациентов с ССД в возрасте 49,6±13,4 года и у здоровых женщин-доноров в возрасте 37±15,3 года. Фагоциты выделяли методом градиентного разделения с помощью растворов Фиколла-Урографина плотностью 1,091 и 1,064 г/мл. Фагоциты стимулировали различными веществами (РМА, fMLF и синтетической пептид WKYMVM), образование активных форм кислорода (АФК) оценивали методом люминолзависимой хемилюминесценции с использованием прибора Chemilum-12. С целью изучения экспрессии FPR1 РНК была выделена из образцов крови больных РА и доноров с использованием набора extract RNA-Evrogen. Двухэтапную RT-PCR проводили путем проведения реакции обратной транскрипции (Thermo Scientific revert aid reverse transcriptase) с последующим выполнением ПЦР в режиме реального времени (SYBR green master mix-Evrogen) с использованием праймеров к гену интереса FPR1 и референсному гену S18. Данные были проанализированы с помощью Rstudio 3.5.1 с использованием критерия Манна-Уитни ( $p \leq 0,05$  было принято как значимое).

**Результаты.** Спонтанная генерация АФК фагоцитами была выше в группе больных РА и ССД по сравнению с группой доноров. Не было выявлено достоверной разницы в продукции АФК фагоцитами между донорами и пациентами в ответ на РМА (1 мкМ). При добавлении низкой дозы fMLF (0,01 мкМ) наблюдалось увеличение уровня продукции АФК гранулоцитами у пациентов с РА (рис.1). Однако, продукция АФК в ответ на добавление высокой дозой fMLF (1 мкМ) и синтетического пептида WKYMVM (0,01 мкМ) были сопоставимы во всех группах (рис.2). По результатам RT-PCR экспрессия гена FPR1 была выше у больных РА по сравнению с донорами (expression fold change = 1,2- 3,4).

**Обсуждение.** Рецепторы формилированных пептидов 1 и 2 (FPR1 и FPR2) участвуют в развитии аутоиммунных заболеваний. Было показано, что фибробласты кожи пациентов с ССД экспрессируют высокие уровни трех рецепторов формилпептидов (FPR1, FPR2 и FPR3) и их активация индуцирует продукцию АФК [3]. С другой стороны, исследования на мышах



с дефицитом FPR2 продемонстрировали ингибирующую роль рецептора в острой модели воспалительного артрита [4].

Мы показали увеличение спонтанной генерации АФК фагоцитами у группы больных РА и ССД, что свидетельствует о преактивированном состоянии клеток. Ответ на PMA не отличался среди групп, что указывает на практически неизменную экспрессию или активность РКС/NADPH-оксидазного (NOX) пути.

Низкая концентрация fMLF селективно активирует FPR1, в то время как полученный ответ на высокую концентрацию fMLF является результатом активации как FPR1, так и FPR2. Однако, FPR2 имеет высокую аффинность к синтетическому пептиду WKYMVM (Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH<sub>2</sub>). Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в группах больных РА и их родственников наблюдалось увеличение продукции АФК гранулоцитами, опосредованной FPR1, но не FPR2.

**Заключение.** Объединив полученные результаты экспрессии генов и продукции АФК, можно заключить, что в фагоцитах у больных РА наблюдается сверх регуляция FPR1 пути, а путь FPR2 либо остается в пределах нормы либо слегка подавляется.

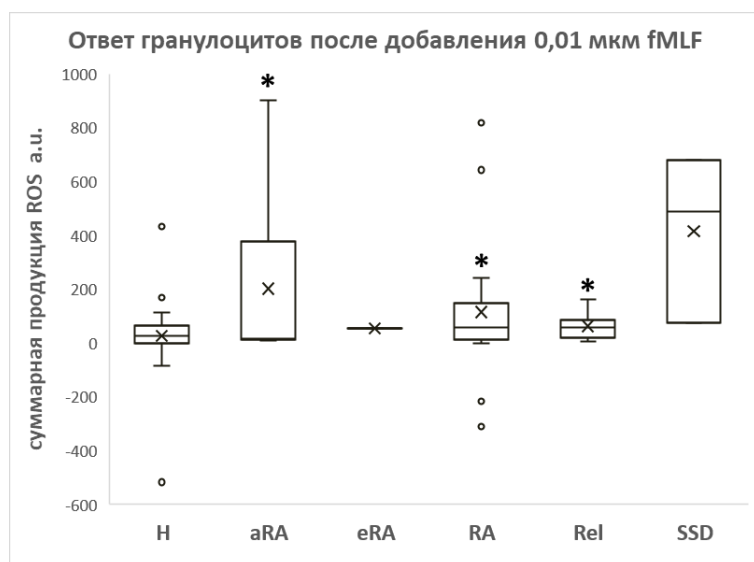


Рис. 1: Ответ гранулоцитов, выделенных у больных с различными стадиями ревматоидного артрита и системного склероза по сравнению со здоровыми донорами при добавлении 0,01 мкм fMLF. звезды указывают, что значение P меньше 0,05.

H: здоровые доноры, aRA: распространенный ревматоидный артрит, eRA: ранний ревматоидный артрит, RA: ревматоидный артрит, Rel: родственники, SSD: системная склеродермия.

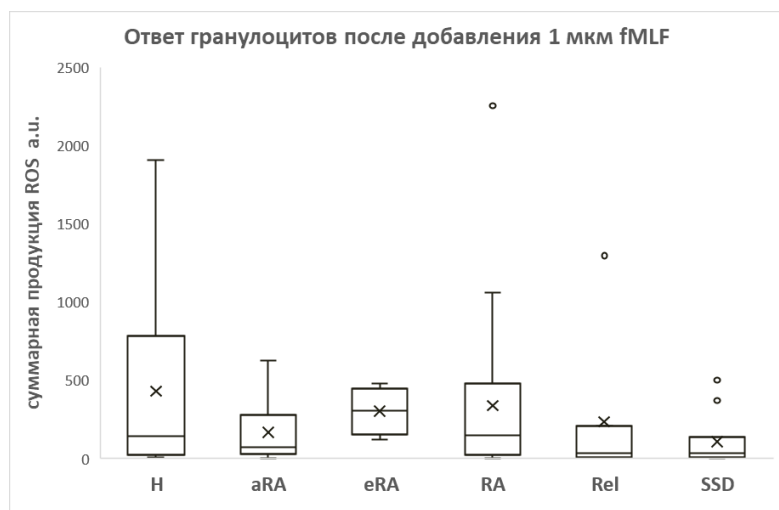


Рис. 2 Ответ гранулоцитов, выделенных у больных с различными стадиями ревматоидного артрита и системного склероза по сравнению со здоровыми донорами при добавлении 1 мкм fMLF. звезды указывают, что значение P меньше 0,05.

H: здоровые доноры, aRA: распространенный ревматоидный артрит, eRA: ранний ревматоидный артрит, RA: ревматоидный артрит, Rel: родственники, SSD: системная склеродермия.

## Список литературы

1. Prevette, N., et al., Formyl peptide receptors at the interface of inflammation, angiogenesis and tumor growth. *Pharmacological research*, 2015. **102**: p. 184-191.
2. Cattaneo, F., M. Parisi, and R. Ammendola, Distinct signaling cascades elicited by different formyl peptide receptor 2 (FPR2) agonists. *International journal of molecular sciences*, 2013. **14**(4): p. 7193-7230.
3. Napolitano, F., et al., N-Formyl Peptide receptors induce radical Oxygen Production in Fibroblasts Derived From systemic sclerosis by interacting With a cleaved Form of Urokinase receptor. *Frontiers in immunology*, 2018. **9**: p. 574.
4. Kao, W., et al., A formyl peptide receptor agonist suppresses inflammation and bone damage in arthritis. *British journal of pharmacology*, 2014. **171**(17): p. 4087-4096.

### АКТИВНОСТЬ ТЕЛОМЕРАЗЫ В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО И УМЕРЕННОГО СТРЕССА, ВЫЗВАННОГО ФИЗИЧЕСКИМИ НАГРУЗКАМИ

Мухаметшина А.Д., Мухаметшина Р.Д., Валеева Е.В., Кравцова О.А.

Кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии  
Институт фундаментальной медицины и биологии  
Казанский Федеральный (Приволжский) университет

[albinam1709@gmail.com](mailto:albinam1709@gmail.com) , 89274973655

**Введение.** При пролиферации клеток теломеры укорачиваются из-за феномена концевой недорепликации эукариотических хромосом, на который впервые обратил внимание наш соотечественник Оловников А.М. еще в 1971 году. Теломераза представляет собой высокомолекулярный комплекс белков (фермент), функция которого состоит в поддержании длины теломерной ДНК на концах хромосомы [1]. Укорочение теломер ведет к явлению репликативного старения, пролиферация клеток останавливается, и клетка надолго переходит в состояние сенесценции. Теломераза, являющаяся обратной транскриптазой, используя матрицу РНК, непрерывно по мере необходимости удлиняет концевой недореплицированный участок ДНК, поэтому теломеразная активность служит биомаркером пролиферативной активности клеток [2].

Результатом воздействия стрессового фактора на организм может являться изменение активности теломеразы, что в свою очередь может привести к различным патологиям. Клетки с измененной активностью теломеразы теряют генетическую стабильность, тем самым могут стать опухолевыми.

В настоящее время механизмы, лежащие в основе взаимосвязи стресса и активности теломеразы, не до конца изучены. В связи с этим, целью данной работы является ознакомление с изменениями активности теломеразы в условиях стресса, связанными с физическими нагрузками различной интенсивности.

**Обсуждение.** Гормональные изменения, связанные со стрессом, в частности, увеличение кортизола, могут послужить сигналом, регулирующим активность теломеразы у человека. Хронически повышенный или чрезмерно высокий уровень кортизола оказывает подавляющее действие на теломеразу мононуклеарных клеток периферической крови [3]. Стресс, в том числе в виде изнурительных физических нагрузок, способствует также

повышению уровня адреналина, креатинкиназы, глюкозы и инсулина, усиливает процессы воспалительного и окислительного стресса. Появляется все больше свидетельств того, что данные биологические факторы работают вместе, ускоряя старение клеток, подавляя активность теломеразы [4].

На данный момент некоторые проведенные на животных экспериментах показывают разные результаты. Так, в частности, было обнаружено, что никаких существенных изменений в активности теломераз в миоцитах или гепатоцитах крыс не наблюдалось после восьминедельного плавательного упражнения. Однако краткосрочные (21 день) долгосрочные (6 мес.) беговые упражнения, проведенные на мышах дикого типа, увеличили теломеразную активность в кардиоцитах. Это было связано с повышенной экспрессией белка TERT (теломеразная обратная транскриптаза), являющимся каталитическим ферментом теломеразы [5]. Некоторые исследования на спортсменах показывают, что упражнения на выносливость или работа в высокоинтенсивном режиме способствует активации теломеразы в лейкоцитах более, чем в 3 раза, при этом наблюдалась сниженная экспрессия ингибиторов клеточного цикла по сравнению с непрофессиональными спортсменами [6].

Активность теломеразы может регулироваться как транскрипционным контролем hTERT, так и посттрансляционной модификацией белка hTERT - фосфорилированием. В ряде экспериментов показано, что изменения активности теломеразы могут происходить в течение нескольких часов и даже минут после воздействия определенных молекулярных стимулов, включая гормоны стресса и факторы роста, содержания уровня глюкозы, ЛДГ через посттрансляционную модификацию белка hTERT [7].

**Заключение.** Все больше исследований показывают, что активность теломеразы ассоциирована с психологическим стрессом и факторами образа жизни в их числе. Существует множество потенциальных молекулярных механизмов, лежащих в основе изменений активности теломеразы. Вероятно, воздействие тяжелой физической нагрузки будет негативно сказываться, а умеренный стресс, связанный с этим же фактором будет способствовать наиболее умеренному уровню активности теломеразы. Следовательно, для предотвращения старения клеток, которое напрямую ассоциировано с активностью теломеразы, важно поддерживать организм в тонусе с помощью физических упражнений, учиться справляться со стрессом и вести здоровый образ жизни.

*Работа поддержана грантом РФФИ № 19-34-90171.*

#### *Список литературы*

1. М. П. Рубцова, Д. П. Василькова, А. Н. Малявко, Ю. В. Нарайкина, М. Э. Зверева, О. А. Донцова. Acta Naturae (русскоязычная версия). 2012; 4(2).
2. Е. Е. Егоров. Теломеры, теломераза, канцерогенез и мера здоровья. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2010; 184-197.
3. E. S. Epel, J. Lin, F. H. Wilhelm, O. M. Wolkowitz, R. Cawthon, N. E. Adler, C. Dolbier, W. B. Mendes, E. H. Blackburn. Cell aging in relation to stress arousal and cardiovascular disease risk factors. Psychoneuroendocrinology. 2006; 31(3):277-287.
4. Y. Gidron, H. Russ, K. Tissarchondou, J. Warner. The relation between psychological factors and DNA-damage: a critical review. 2006; 72(3):291-304.
5. M. Werner, J. D. Kearns, V. Zadorozhnaya, C. Lynch, E. O'Dea, M. P. Boldin, A. Ma, D. Baltimore, A. Hoffmann. Encoding NF- $\kappa$ B temporal control in response to TNF: distinct roles for the negative regulators I $\kappa$ B $\alpha$  and A20. Genes & development. 2008; 22(15): 2093-2101.

6. M. Werner, P. Thuriaux, J. Soutourina. Structure-function analysis of RNA polymerases I and III. *Current opinion in structural biology*. 2009; 19(6):740-745.

7. W. Denga, S. T. Cheunga, S. W. Tsaob, X. M. Wanga, A. F. Y. Tiwaria. Telomerase activity and its association with psychological stress, mental disorders, lifestyle factors and interventions. *Scienedirect*. 2016; 60:150-163.

## **ВЛИЯНИЕ МИКРОДОЗ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ**

*Пайгачкина А.С., Попова О.В.*

ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет»

[payga4kina.a@yandex.ru](mailto:payga4kina.a@yandex.ru)

**Введение.** Чрезмерная активация перекисного окисления липидов и белков и патологическое действие продуктов перекисидации происходят под влиянием многочисленных факторов внешней среды. Раскрытие роли свободнорадикального окисления липидов и белков биомембран в первичных процессах адаптации дало основание к успешному применению антиоксидантов в качестве средств неспецифического повышения устойчивости организма. Возможным решением проблемы развития окислительного стресса может быть употребление эффективных и безопасных природных антиоксидантов. С этой точки зрения интересным классом природных соединений являются эфирные масла, биологическая активность которых зависит от их состава. На модельных системах многие эфирные масла проявляют антиоксидантную активность и ингибируют окислительные процессы. Реальная же их эффективности зависит от компонентного состава, механизмов влияния компонентов друг на друга и их взаимодействия с клеточными структурами.

Целью настоящего исследования было изучение влияния микродоз эфирных масел грейпфрута, аниса и розмарина на интенсивность процессов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков *in vivo*.

**Материалы и методы.** В эксперименте были использованы цитрусовые и пряные эфирные масла, используемые в косметической и пищевой промышленности. Эфирное масло Грейпфрута розового (*Citrus paradise Macfad*). Маркировка – 100% натуральное эфирное масло, полученное способом холодного прессирования свежей кожуры плодов. Производитель – «Синам». Эфирное масло Аниса обыкновенного (*Anisum vulgare Gaerth*). Маркировка – 100% натуральное эфирное масло, полученное способом паровой дистилляции. Производитель – «Синам». Эфирное масло Розмарина лекарственного (*Rosmarinus officinalis L*). Маркировка – 100% натуральное эфирное масло, полученное способом паровой дисстиляции. Производитель – «Аспера».

В эксперименте были использованы белые беспородные половозрелые крысы (самки) массой 160-200 г. Животные контрольной группы содержались на стандартной пищевом рационе, ежедневно получали чистую питьевую воду. Животные опытных групп содержались в отдельном помещении вивария на стандартном пищевом рационе, ежедневно в течение 3-х месяцев получали исследуемые эфирные масла, которые добавляли животным в питьевую воду, таким образом, что доза эфирного масла составляла 350 нг/сутки. Для

исследования интенсивности процессов перекисного окисления липидов оценивали содержание конъюгированных диеновых структур и малонового диальдегида в плазме крови, гемолизате эритроцитов, гомогенате печени и легкого. Для исследования интенсивности окислительной модификации белков оценивали уровень среднемолекулярных пептидов и карбонильных производных белков в плазме крови. Забор крови и органов осуществляли после декапитации животных. Оценку показателей проводили незамедлительно.

**Результаты.** Кровь, печень и легкое характеризуется одним из самых высоких уровней генерации активных форм кислорода, что связано с функциональной нагрузкой этих тканей. Уровень конъюгированных диеновых структур определяли спектрофотометрически при 233 нм после экстракции из биологического материала смесью гептан-изопропанол. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Содержание диеновых конъюгатов, М±m

Группы	Гемолизат эритроцитов, отн.ед./мл	Плазма крови, отн.ед./мл	Гомогенат печени, отн.ед./мл	Гомогенат легкого, отн.ед./мл
Контроль	1,818±0,047	3,798±0,062	1,614±0,081	1,018±0,026
Грейпфрут	0,927±0,014*	1,925±0,041*	1,478±0,047	0,962±0,015
Анис	1,053±0,012*	2,232±0,023*	1,521±0,023	1,065±0,014
Розмарин	1,356±0,019*	2,868±0,034*	1,615±0,047	0,982±0,016

\* Различия между опытом (ЭМ грейпфрута, аниса, розмарина) и контролем (отсутствие ЭМ) статистически достоверны ( $p \leq 0,01$ )

Количество малонового диальдегида в пробах оценивали после реакции с тиобарбитуровой кислотой спектрофотометрически при 532 нм. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Содержание малонового диальдегида, М±m

Группа	Эритроциты, мкмоль/л	Плазма крови, мкмоль/л	Гомогенат печени, мкмоль/л	Гомогенат легкого, мкмоль/л
Контроль	5,737±0,271	2,289±0,108	0,144±0,005	0,267±0,017
Грейпфрут	3,060±0,139*	0,774±0,074*	0,074±0,005*	0,114±0,005*
Анис	3,370±0,183*	0,869 ±0,076*	0,060±0,006*	0,120±0,007*
Розмарин	4,161±0,181*	1,084±0,074*	0,140±0,006	0,239±0,006

\* Различия между опытом (действие ЭМ грейпфрута, аниса, розмарина) и контролем (отсутствие ЭМ) статистически достоверны ( $p \leq 0,01$ )

О содержании среднемолекулярных пептидов (СМП) судили на основании прямой спектрометрии депротенинизированного супернатанта плазмы крови при 254, 260 и 280 нм.

Об уровне карбонильных производных белков (КПБ) судили по реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-ДНФГ с последующей регистрацией на спектрофотометре при 363 нм.

Полученные данные представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Содержание продуктов окислительной модификации белков в плазме крови крыс

Исследуемый показатель	Контроль (без масла)	Эфирное масло		
		Грейпфрут	Анис	Розмарин
СМП, у.е./мл плазмы (m±M)	3,323 ± 0,027	1,955 ± 0,065 *	2,895 ± 0,050	3,005 ± 0,057
КПБ, у.е./мл плазмы (m±M)	0,658 ± 0,019	0,295 ± 0,011 *	0,393 ± 0,020 *	0,470 ± 0,019

\* - Различия между опытом (действие эфирных масел грейпфрута, аниса, розмарина) и контролем (отсутствие эфирных масел) статистически достоверны (p<0,05)

**Обсуждение.** Все исследуемые эфирные масла снижали образование диеновых конъюгатов в эритроцитах и плазме крови, проявляя антиоксидантный эффект, но не оказали существенного влияния на уровень первичных продуктов перекисного окисления липидов в печени и легких. В наибольшей степени продукция диеновых конъюгатов подавлялась эфирным маслом грейпфрута. Эфирные масла грейпфрута и аниса также ингибировали образование малонового диальдегида в плазме крови, эритроцитах, печени и легких. Эфирное масло розмарина оказало влияние на уровень малонового диальдегида только в эритроцитах и плазме крови, снижая его. Эфирное масло грейпфрута показало исключительно высокую антиоксидантную активность по отношению к процессу фрагментации белков и появлению среднемолекулярных пептидов в плазме крови. Образование карбонильных производных белков ингибировалось эфирными маслами грейпфрута и аниса.

**Заключение.** В целом все три эфирных масла показали хорошую антиоксидантную активность. Разный характер действия эфирных масел на процесс перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков вероятно обусловлен их компонентным составом, возможным влиянием компонентов друг на друга и потенциалом их антиоксидантного действия. Анализ всех исследуемых показателей позволяет заключить, что наибольшим антиоксидантным потенциалом обладает эфирное масло грейпфрута. По-видимому, за счет преобладающего компонента – лимонена и незначительного влияния других компонентов.

## ВЛИЯНИЕ КОНТРАКЦИИ СГУСТКОВ КРОВИ НА СКОРОСТЬ ВНЕШНЕГО И ВНУТРЕННЕГО ФИБРИНОЛИЗА

А.Д. Пешкова, Р.И. Литвинов

НИЛ «Белково-клеточные взаимодействия», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

[alinapeshkova@gmail.com](mailto:alinapeshkova@gmail.com); +7 917 885 9787

**Введение.** Фибринолиз представляет собой протеолиз полимерных фибриновых сетей, которые образуют структурную основу сгустков крови и тромбов. Расщепление фибрина сопровождается распадом сгустков и тромбов, закупоривающих кровеносные

сосуды, и восстановлением кровотока *in vivo*. Эффективность фибринолиза зависит от многих факторов, которые определяют структуру сгустков и их состав. Остается открытым вопрос о связи фибринолиза с естественной контракцией (сжатием) сгустков крови.

Цель работы заключалась в исследовании скорости расщепления сжатых (контрактированных) и не сжатых сгустков.

**Материалы и методы.** Из одного и того же образца крови формировали два сгустка, в одном из которых контракцию предотвращали путем ингибирования полимеризации актина (латрункулин А), инаktivацией миозина IIa (блеббистатин) или блокировкой интегринa  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (абциксимаб). Для исследования внутреннего фибринолиза до образования и контракции сгустка в кровь добавляли 75 нг/мл тканевого активатора плазминогена (t-PA), после чего инициировали свертывание крови и активацию тромбоцитов тромбином. Кинетику лизиса определяли оптически по уменьшению размера сгустка. Для изучения внешнего фибринолиза в кровь добавляли человеческий  $^{125}\text{I}$ -фибриноген, формировали сгусток и создавали условия для контракции, а затем добавляли 75 нг/мл t-PA. Кинетку внешнего фибринолиза определяли по скорости высвобождения радиоактивных продуктов расщепления фибрина.

**Результаты.** Установлено, что при внутреннем фибринолизе контрактированные сгустки расщеплялись примерно в 2 раза быстрее по сравнению со сгустками с нарушенной контракцией. Напротив, внешний фибринолиз протекал гораздо медленнее в контрактированных сгустках. Неконтрактированные сгустки высвобождали в 2-4 раза больше продуктов протеолиза фибрина в течение первых 30 минут и продолжали лизироваться примерно в 4 раза быстрее, чем контрактированные сгустки в течение 4 часов после добавления t-PA.

**Обсуждение.** Противоположное влияние контракции сгустков крови на внутренний и внешний фибринолиз объясняется тем, что скорость внешнего лизиса зависит от проницаемости сгустков для фибринолитических ферментов, которая снижена в компактных сгустках. При внутреннем фибринолизе высокая скорость лизиса сжатых сгустков объясняется пространственной близостью расщепляемых фибриновых волокон.

**Заключение.** Связь между контракцией сгустков крови и фибринолизом может иметь важные последствия для чувствительности тромбов к естественному фибринолизу и тромболитической терапии.

*Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета, гранта 19-015-00075 РФФИ и гранта 18-415-160004 РФФИ и РТ.*

## ПРОБЛЕМЫ КЛАССИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

*Мухаметгалиева А.Р.\**, Фаттахова А.Н., Массон П.

Казанский (Приволжский) федеральный университет

[\\*aliya\\_rafikovna@mail.ru](mailto:*aliya_rafikovna@mail.ru)

**Введение.** Холинэстеразы (ХЭ) – эта группа ферментов, которые выполняют ключевую роль в процессах нейрогуморальной регуляции, а также в детоксикации организма от фосфорорганических соединений и лекарственных средств [1]. Так как некоторые ингибиторы ХЭ используются для лечения различных болезней (Альцгеймера, деменции, миастении), существует потребность в исследовании механизмов ингибирования и активации ХЭ лигандами.

**Материалы и методы.** Ферментативная кинетика продолжает оставаться одним из подходов, используемые при изучении активности ферментов. Классические подходы анализа активности холинэстераз имеют несколько нерешенных проблем. В частности, многие природные лиганды не содержат групп, которые позволяют детектировать их в водных средах, поэтому прямой спектрофотометрический анализа таких субстратов неприменим [2]. Низкое сродство субстрата к ферменту или низкая растворимость субстрата позволяет исследовать только ограниченный диапазон концентраций субстрата. Высокотоксичные эфиры, как субстраты, не отвечают правилам безопасности. Поэтому существует потребность в усовершенствовании методик для определения активности холинэстераз в водных средах.

**Обсуждение.** Для определения кинетических параметров холинэстераз предлагается использовать методику, которая предполагает использование двух конкурирующих субстратов в реакционной смеси, один из которых является хромогеном, другой субстрат невидим в условиях анализа. Затем сравнивая реакцию в присутствии и отсутствии невидимого субстрата, можно определить кинетические константы невидимого субстрата [3].

**Заключение.** Наш новый «метод конкурирующих субстратов» позволяет решать проблемы и рассчитывать все требуемые константы, и впоследствии применять его для расчета терапевтических доз ингибиторов или регуляторов активности ХЭ.

### *Список литературы*

1. Lockridge O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol Ther.* 2015 Apr; 148: 34-46.
2. I.P. Ivanov, H.J. Miteva, V.M. Yomtova A simplified equation allowing the determination of kinetic constants of “invisible” substrates, *Anal. Biochem.* 2003; 323, 247-248.
3. Mukhametgalieva A.R., Aglyamova A.R., Lushchekina S.V., Goličnik M., Masson P. Time-course of human cholinesterases-catalyzed competing substrate kinetics. *Chem Biol Interact.* 2019 Sep 1; 310: 108702. doi: 10.1016/j.cbi.2019.06.015.



## МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ И АНТИМИКОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНОГО ПИРИДОКСИНА И ТЕРБИНАФИНА

*Сабирова А.Э., Каюмов А.Р., Лисовская С.А., Павельев Р.С., Гарипов М.Р., Штырлин Н.В., Штырлин Ю.Г*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Научно-образовательный центр фармацевтики, Казань

[Alinka.zam@mail.ru](mailto:Alinka.zam@mail.ru)

**Введение.** Многие патогенные и условно-патогенные микроорганизмы способны формировать сообщества микробных клеток - биопленки, погруженные в полисахаридный матрикс. В клинической практике, чаще всего они образуются на поверхности медицинских приборов, катетеров и пластиковых имплантатов, вызывающих хронические реинфекции и воспалительные осложнения в послеоперационном периоде. Бактерии в составе биопленки чрезвычайно устойчивы к биоцидам, антибиотикам, а также иммунной системе человека. что, на данный момент, является глобальной проблемой во всем мире [1]. Поэтому поиск новых эффективных антибактериальных соединений является актуальной задачей современной фармацевтики. В НОЦ Фармацевтики КФУ на основе пиридоксина (витамина В<sub>6</sub>) и тербинафина были синтезированы соединения, одно из которых, под условным названием KFU-127 в предварительных исследованиях продемонстрировал высокую эффективность против бактериальных и грибковых клеток.

**Материалы и методы.** Антимикробную и антимикотическую активность KFU-127 оценивали методами микроразведений и подсчета КОЕ. Генотоксичность оценивали в SOS-хромотесте и тесте Эймса, цитотоксичность – в МТТ тесте. Для выявления мишеней использованы методы флуоресцентной спектроскопии, 2D-электрофореза, масс-спектрометрии.

**Результаты.** Антимикробная и антимикотическая активность KFU-127 были сопоставимы или даже выше чем у контрольных противогрибковых (тербинафин, флуконазол) и антимикробных препаратов (мирамистин, бензалконий хлорид). При этом KFU-127 убивало клетки в составе биопленки в концентрациях в 2-4 раза ниже, чем у препаратов сравнения, а также было способно к эрадикации смешанной биопленки *S. aureus*-*C. albicans*. Несмотря на принадлежность KFU127 к четвертичным аммонийным солям, соединение слабо влияло на целостность мембраны бактерий. Анализ протеома клеток, выращенных в присутствии сублетальных концентраций KFU-127, позволил установить, что одними из молекулярных мишеней вещества являются пиридоксаль-зависимые ферменты. Ни для грибковых, ни для бактериальных патогенов не наблюдалось развития стабильной резистентности к KFU-127; не выявлена мутагенность в тесте Эймса, а цитотоксичность сравнима с мирамистином и бензалкония хлоридом.

**Обсуждение.** Ранее было показано, что четвертичные аммонийные соли способны оказывать бактерицидный эффект в отношении микроорганизмов в составе биопленки [2]. Поэтому исследовали антимикробное действие соединения на биопленки *S. aureus* и *C. albicans*. Соединение KFU-127 было эффективно против бактериальных и грибных биопленок *C. albicans*, кроме того, оно эффективно убивало клетки как *S. aureus*, так и *C. albicans* в составе смешанной биопленки по сравнению с препаратами сравнения. Механизм бактерицидного действия четвертичных аммонийных солей заключается в повреждении мембраны бактерий. Поэтому исследовали влияние исследуемых веществ на

мембраны клеток *S.aureus* *C.albicans* и путем оценки изменения их потенциала в присутствии биоцидов.

Результаты исследования показали, что в присутствии KFU-127 интенсивность флюоресценции в клетках *S.aureus* была значительно ниже, чем в присутствии бензалкония хлорида, что говорит о повреждении мембраны. В случае *C.albicans*, в присутствии KFU-127 и бензалкония хлорида происходило незначительное снижение флюоресценции, затем уровень восстанавливался. В то же время, тербинафин приводил к значительно большему снижению сигнала (рисунок 1). Следовательно, механизм действия KFU-127 на клетки микромицета отличается от действия тербинафина, и, скорее всего, вещество имеет другую клеточную мишень.

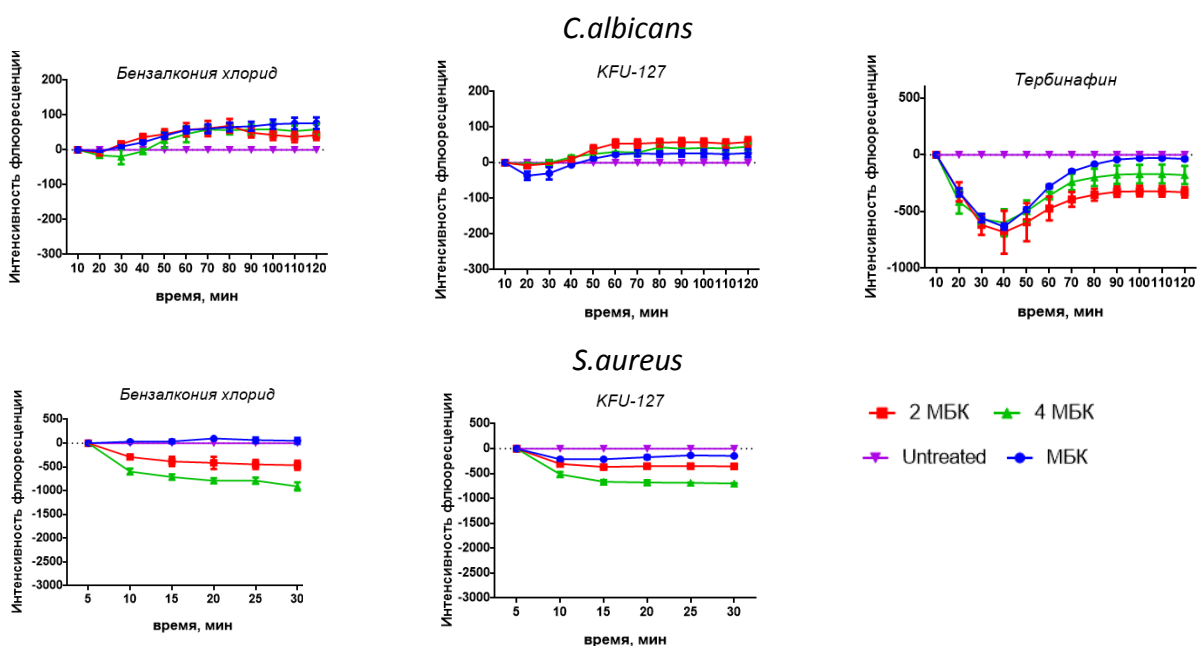


Рисунок 1 - Интенсивность флюоресценции после воздействия соединений на клеточные мембраны

Все исследуемые соединения являются производными пиридоксина, что позволяет предположить образование производного пиридоксаль, которое возможно является ингибитором пиридоксаль-зависимых ферментов. Чтобы попробовать идентифицировать молекулярные мишени KFU-127, анализировали изменения в протеоме *S. aureus* и *E.coli*, вызванные действием данного соединения. Среди белков с повышенным количеством содержания в клетках, были идентифицированы белки различных биохимических путей, преимущественно гликолиза и цикла Кребса. Вероятно, их повышенный синтез является ответом клетки на снижение мембранного потенциала. С другой стороны, подобной картины не наблюдалось в случае мирамистина и бензалкония хлорида. А так как многие пиридоксаль зависимые ферменты участвуют в синтезе аминокислот, нуклеотидов и в энергетическом обмене, можно предположить прямое влияние соединений (или продуктов их метаболизма) на активность данных ферментов.

Кроме того, была обнаружена повышенная индукция пиридоксаль-зависимых ферментов – гистидинкиназы и глутаматдекарбоксилазы, относящихся к биохимическому

пути метаболизма аминокислот. На этом основании было сделано заключение, что данные пиридоксаль-зависимые ферменты, по всей видимости, являются молекулярной внутриклеточной мишенью KFU-127, однако механизм, приводящий к их индукции, требует дальнейших исследований.

**Заключение.** Таким образом, KFU-127 представляет собой новый перспективный антимикробный препарат широкого спектра действия для терапии полимикробных биопленок *S.aureus* и *C.albicans*. Однако его механизм действия на клетки *C.albicans* схоже с действием бензалкония хлорида и отличается от действия тербинафина, и, скорее всего, вещество имеет другую клеточную мишень, что требует дальнейших исследований.

#### *Список литературы*

1. **Croes, S.C.** *Staphylococcus* in providing glucose in physiological terms from *Staphylococcus aureus* [Text] / S.C. Croes, R.K.Durenberg, M.L. Bumans, P.S. Beisser PS // Microbiology BMC.- 2009. – V. 9. P.29.
2. **Каюмов А.Р.,** Nureeva A.A, Trizna E.Y, New derivatives of pyridoxine exhibit high antibacterial activity against biofilm-embedded staphylococcus cells//BioMed Research International. - 2015. - Vol.2015, Is.. - Art. № 890968.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-33-20051*

### **ПРИМЕНЕНИЕ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА, ФИБРОИНА ШЕЛКА И ОКСИДА ГРАФЕНА ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ГЛУБОКИХ КОЖНЫХ РАН**

*Сыромятникова В. Ю., Журавлева М. Н., Масгутова Г. А., Закирова Е. Ю., Гатина Д. З., Салафутдинов И. И.*

НИЛ «OpenLab генные и клеточные технологии», ИФМиБ, КФУ

+79376134410, [Lera\\_181990@mail.ru](mailto:Lera_181990@mail.ru)

**Введение.** Использование повязок на основе комбинации хитозана, фиброина шелка и оксида графена является перспективным направлением для поддержания гомеостаза и стимуляции регенерации в процессе заживления кожных ран.

**Материалы и методы.** Были разработаны и исследованы гидрогели: D (Daba фиброин шелка + хитозан) и D+G (Daba фиброин шелка + хитозан + оксид графена). Моделирование кожной травмы проводили на взрослых самцах крыс линии Wistar весом 200-250 гр. С лопаточной части спины крысы удаляли волосы путем депиляции, далее формировали полнослойный круглый кожный дефект диаметром 1 см. Наносили гидрогели в объеме 300 мкл на рану. Контролем служил незаполненный гидрогелем кожный дефект. Для изоляции раны закрывали пластырем на тканевой основе на срок 7 дней, после чего проводили смену повязки и гидрогеля. Животных выводили из эксперимента на сроках 7 суток и 14 суток, ткани области раны забирали для гистологического исследования. Образцы кожи фиксировали в 10% забуференном нейтральном формалине, заливали в парафин. Поперечные срезы кожи окрашивали азокармином по Гейденгайну.

**Результаты.** При применении гидрогелей D и D+G через 7 суток область кожного дефекта была представлена плотной волокнистой соединительной тканью, окрашенной в светло-голубой цвет. Ткань была богато васкуляризирована, наблюдался эритростаз и диapedез эритроцитов, а также богато инфильтрирована лейкоцитами. Эпителизация в дне раны отсутствовала, наблюдалась краевая эпителизация. Через 14 суток применения гидрогеля D эпителизация раны была по-прежнему только краевая, коллаген подлежащей соединительной ткани был окрашен в светло-голубой цвет, сохранилась богатая васкуляризация и эритростазы. Однако использование гидрогеля D+G на 14 суток продемонстрировало полную эпителизацию раны, подлежащая соединительная ткань содержала железы и волосяные фолликулы, коллаген был окрашен в интенсивно синий цвет.

#### **Обсуждение**

Полученные нами положительные результаты при использовании гидрогелей D и D+G для регенерации полнослойных кожных дефектов согласуются с ранними исследованиями в данной области. Так в работе Movaffagh J. с соавт [1] сообщалось об увеличении выработки коллагена и усилении повторной эпителизации, приводящих к ускоренному заживлению ран, при применении хитозансодержащих многослойных гидрогелевых повязок, нанесенных на полнослойные раны у диабетических крыс. В исследовании Kai-Li Mao с соавт. [2] было показано, что нановолокна фиброина шелка способствуют адгезии человеческих кератиноцитов и фибробластов, а также усиливают отложение коллагена I типа *in vitro*.

**Заключение.** Применение гидрогелей на основе комбинации хитозана, фиброина шелка и оксида графена показало эффективность в регенерации глубоких кожных ран.

#### *Список литературы:*

1. J. Movaffagh, B. S. Fazly-Bazzaz, A. T. Yazdi, A. Sajadi-Tabassi, M. Azizzadeh, E. Najafi, A. Moradi. Wound Healing and Antimicrobial Effects of Chitosan-hydrogel/Honey Compounds in a Rat Full-thickness Wound Model. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*, 2019, 31(9): 228-235.

2. K. L. Mao, Z. L. Fan, J. D. Yuan, P. P. Chen, J. J. Yang, J. Xu, Y. Sohawon. Skin-penetrating polymeric nanoparticles incorporated in silk fibroin hydrogel for topical delivery of curcumin to improve its therapeutic effect on psoriasis mouse model. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, 160: 704-714.

*Работа поддержана грантом РФФИ 18-54-45023 «Исследование фундаментальных механизмов регенерации глубоких кожных ран в ответ на генную терапию с применением полиэлектролит - гидрогеля».*

### **ВЛИЯНИЕ АГОНИСТА NMDA-РЕЦЕПТОРОВ N-МЕТИЛ-D-АСПАРТАТА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СПОНТАННО-АКТИВНЫХ НЕЙРОНОВ ВИСЦЕРАЛЬНОГО ГАНГЛИЯ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ**

*Фролова Анастасия Владимировна, Силантьева Динара Ирековна, Андрианов Вячеслав Вадимович, Гайнутдинов Халил Латыпович*

Казанский федеральный университет, кафедра физиологии человека и животных  
[anvfrolova@gmail.com](mailto:anvfrolova@gmail.com), 89656083626

**Введение.** К настоящему моменту появилось значительное количество данных о том, что нарушения в функционировании глутаматергической системы мозга приводят к таким

патологическим состояниям, как: расстройства когнитивных функций, шизофрения, амнезия, моторные дисфункции. На клеточном уровне показано, что применение антагонистов глутаматных рецепторов может замедлить восстановление выживших после травмы нейронов.

Именно поэтому большое значение имеет изучение молекулярных и клеточных механизмов функционирования глутаматных рецепторов, которое может существенно облегчить фармакологическое моделирование связанных с этими рецепторами процессов и дальнейшую разработку препаратов. С этой целью были проведены исследования влияния агониста глутаматных рецепторов NMDA N-метил-D-аспартата на спонтанно-активные нейроны висцерального ганглия виноградной улитки.

**Материалы и методы.** Эксперименты были проведены на изолированном препарате нейронов *Helix lucorum*. В раствор, омывающий препарат нервной системы моллюска, добавляли раствор N-метил-D-аспартата в концентрации 60 мкмоль. Электрофизиологические измерения проводились по стандартной методике при комнатной температуре с применением внутриклеточных стеклянных микроэлектродов. Регистрировалась спонтанная активность идентифицированных нейронов висцерального ганглия. Анализировались величины мембранного потенциала, порога генерации и амплитуды потенциала действия, средняя частота спонтанной импульсной активности. Контролем служила регистрация электрофизиологических характеристик исследуемых клеток до добавления N-метил-D-аспартата. Результаты были статистически обработаны с использованием однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями (ANOVA).

**Результаты.** Мембранный потенциал спонтанно активных нейронов висцерального ганглия достоверно смещался в сторону деполяризации до минус  $42,1 \pm 1,3$  мВ через 20 минут после добавления N-метил-D-аспартата в раствор, омывающий нервную систему моллюска, по сравнению со значением  $V_m$  в контроле — минус  $52,3 \pm 1,2$  мВ ( $p < 0,05$ ). Деполяризация  $V_m$  присутствовала на 10 (минус  $43,8 \pm 1,3$  мВ) и на 40 минуте (минус  $43 \pm 1,6$  мВ) после добавления N-метил-D-аспартата, однако его значения статистически достоверно отличались от значений в контроле только до 30 минуты (минус  $42,5 \pm 1,3$  мВ).

Порог генерации потенциала действия спонтанно активных нейронов висцерального ганглия понижался до  $9 \pm 0,5$  мВ ( $p < 0,05$ ) через 20 минут после добавления N-метил-D-аспартата в раствор и оставался достоверно сниженным до 30 минуты ( $9,3 \pm 0,5$  мВ) по сравнению со значениями в контроле ( $15,4 \pm 1,8$  мВ) ( $p < 0,05$ ). Через 10 ( $9,3 \pm 0,4$  мВ) и через 40 минут ( $10,8 \pm 0,2$  мВ) после добавления N-метил-D-аспартата  $V_t$  был ниже, чем в контроле, но данное различие не было статистически достоверным.

Амплитуда потенциала действия спонтанно активных нейронов висцерального ганглия начинала достоверно уменьшаться до  $50 \pm 3,2$  мВ ( $p < 0,05$ ) уже на 10 минуте после добавления N-метил-D-аспартата в раствор, омывающий нервную систему, по сравнению со значениями в контроле ( $57 \pm 3,3$  мВ) и оставалась достоверно сниженной в течение 40 минут после добавления N-метил-D-аспартата.

На рисунке 1 представлено наложение фрагментов записи активности нейрона V11 в контроле и на 20 минуте эксперимента, на котором продемонстрированы изменения исследованных параметров — деполяризация, уменьшение порога генерации и амплитуды потенциала действия. Также на рисунке видно учащение генерации потенциалов действия, но данное различие не было статистически достоверным.

**Обсуждение.** Когда N-метил-D-аспартат связывается с сайтом связывания глутамата NMDA-рецептора, происходит ряд конформационных изменений белков воротного механизма, что в итоге приводит к открытию ионного канала, селективного к катионам, что ведёт к притоку в клетку  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , а  $\text{K}^+$  покидает клетку [5]. В отличие от AMPA-рецепторов, которые представляют собой преимущественно натриевые каналы, NMDA-рецепторы позволяют поступать как натрию, так и кальцию [3]. У млекопитающих при воздействии N-метил-D-аспартата происходит деполяризация клеточной мембраны не только нервных, но и мышечных клеток [2].

Существуют данные, согласно которым, у моллюсков механизм активации NMDA-рецепторов происходит по такому же принципу. Например, мембрана нейросекреторных светло-желтых клеток *Lymnaea stagnalis* при воздействии N-метил-D-аспартата также деполяризуется благодаря входящим через открытый ионный канал NMDA-рецептора  $\text{Na}^+$ - и  $\text{Ca}^{2+}$ -токами. Индуцированные N-метил-D-аспартатом деполяризующие  $\text{Na}^+$ - или  $\text{Ca}^{2+}$ -токи также описаны у *Aplysia californica* [4]. Полученные в ходе данной работы результаты согласуются с более ранними исследованиями, что позволяет предположить, что механизм NMDA-рецептор-опосредованной деполяризации сходен с таковым у других моллюсков и млекопитающих.

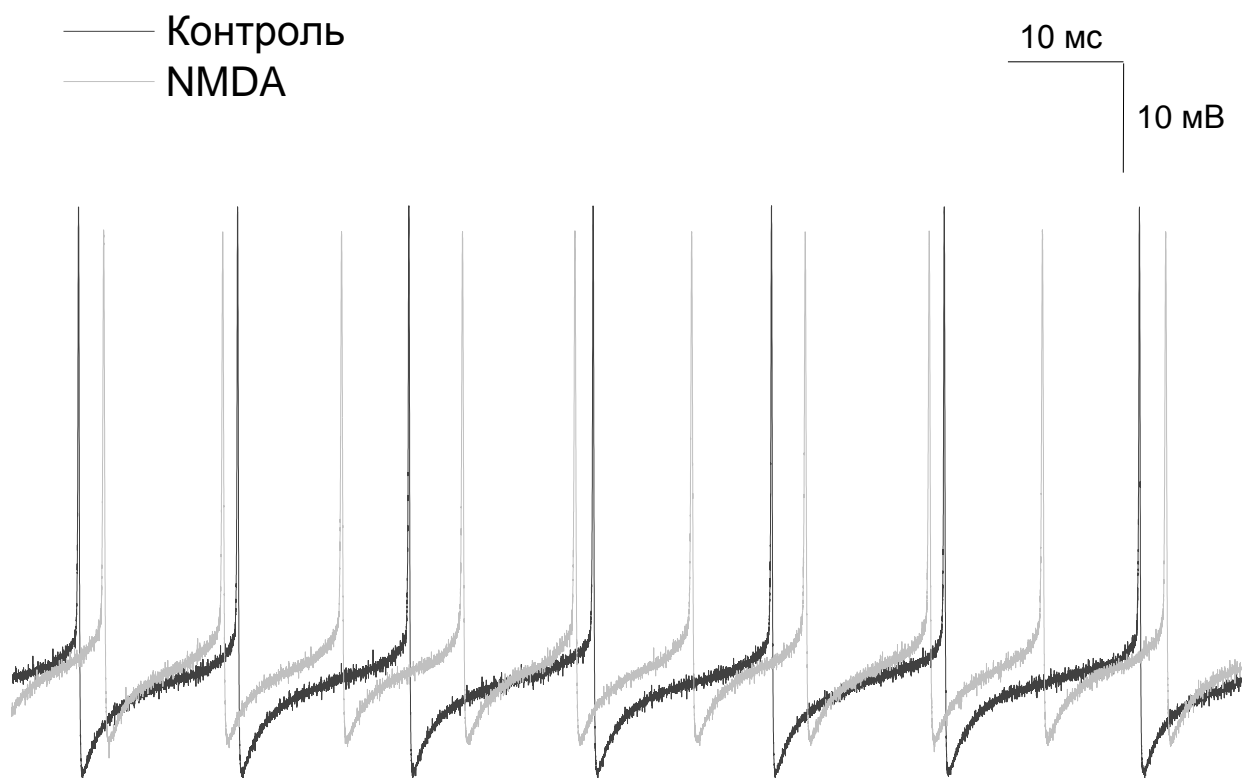


Рисунок 1 — Наложение фрагментов записи спонтанной активности нейрона V11 в контроле и на 20 минуте эксперимента с N-метил-D-аспартатом

**Заключение.** Результаты, полученные в ходе дипломной работы, позволяют сделать заключение о том, что NMDA-рецепторы присутствуют на мембране спонтанно-активных нейронов висцерального ганглия виноградной улитки и участвуют в их электрогенезе.

Активация этих рецепторов вызывает значимые сдвиги мембранного потенциала, снижение порога генерации и амплитуды потенциала действия. Таким образом, виноградная улитка может являться потенциальным объектом для изучения молекулярных и клеточных механизмов функционирования глутаматергической системы

#### Список литературы

1. С. В. Солнцева, В.П. Никитин. Эффекты агонистов NMDA рецепторов глутамата и серотонина на разных стадиях амнезии, вызванной нарушением реконсолидации долговременной памяти. *Нейрохимия*. 2010; 27: 214–220.
2. С. Е. Проскурина, К. А. Петров, Е. Е. Никольский. Влияние активации NMDA-рецепторов на мембранный потенциал покоя мышечной клетки в нервно-мышечном синапсе в условиях наличия или отсутствия ионов магния. *Acta naturae*. 2018; 10: 108-111.
3. A. S. Pivovarov, F. Calahorro, R. J. Walker. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pump and neurotransmitter membrane receptors. *Invertebrate Neuroscience*. 2019; 19: P.1-11.
4. J. T. Ha, A. B. Kohn, Y. V. Bobkova, L. L. Moroz. Molecular characterization of NMDA-like receptors in *Aplysia* and *Lymnaea*: relevance to memory mechanisms. 2006; *Biological Bulletin*; 210; 255-270.
5. M. Wu, P. Katti, Y. Zhao, R. W. Peoples. Positions in the N-methyl-D-aspartate receptor GluN2C subunit M3 and M4 domains regulate alcohol sensitivity and receptor kinetics. *Alcohol Clin Exp Res*. 2019; 43: 14-42.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ШТАММА ЭНДОФИТНЫХ АКТИНОБАКТЕРИЙ *STREPTOMYCES ZAOMYCETICUS* GI01

Ягудина И.Р.<sup>1</sup>, Хабибрахманова В.Р.<sup>2</sup>, Карамова Н.С.<sup>1</sup>  
[ilyuza.yagudina@mail.ru](mailto:ilyuza.yagudina@mail.ru)

**Введение.** Инфекции дыхательных путей (ИДП) представляют собой наиболее распространенные и частые инфекционные заболевания у человека. Каждый год в мире около 20% населения болеют респираторными заболеваниями. ИДП являются причиной 4 млн. смертельных случаев ежегодно [1]. Особую опасность представляют собой внутрибольничные респираторные инфекции (ВБРИ), вызываемые микроорганизмами, устойчивыми к применяемым в настоящее время антибиотикам [2]. В связи с вышесказанным, актуальным является поиск новых антимикробных препаратов, эффективных в отношении возбудителей ВБРИ. В последние десятилетия внимание многих исследователей сосредоточено на эндофитных микроорганизмах, способных синтезировать широкий спектр биологически активных соединений [3].

**Целью** настоящей работы явился анализ вторичных метаболитов эндофитных актинобактерий *Streptomyces zaomyceticus* GI01, ранее выделенных нами из лекарственного растения тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium* L.) и проявивших антимикробный эффект в отношении изолятов микроорганизмов, ассоциированных с ВБРИ [4].

**Материалы и методы.** Объектом исследования был штамм эндофитных актинобактерий *Streptomyces zaomyceticus* GI01. Экстрагирование метаболитов проводили с применением метода жидкость–жидкостной экстракции культуральной жидкости и гомогената клеток

разными растворителями. Для анализа состава эндо- и экзометаболитов исследуемого штамма актинобактерий использовали высокоэффективную тонкослойную хроматографию (ВЭТСХ) (лабораторный комплекс САМАГ, Швейцария). ТСХ проводилась в системе растворителей: бутанол-уксусная кислота-вода. В качестве проявителей пластин ТСХ использовали: 5% раствор серной кислоты в этаноле; 0.5 н раствор гидроксида натрия в этаноле; 1 н раствор соляной кислоты в этаноле; нингидриновый реактив. Денситометрическую обработку полученных хроматограмм провели на приборе TLC Scanner 3 (САМАГ, Швейцария) с программным обеспечением «winCATS» в режиме адсорбции.

**Результаты и обсуждения.** Установлено, что в ацетоновом экстракте гомогената клеток содержится 10 веществ, в этилацетатном экстракте культуральной жидкости с pH=8.6 - 8 веществ, с pH=3.4 – 11 веществ, в бутанольном экстракте культуральной жидкости с pH=8.6 – 7 веществ, с pH=3.4 – 4 вещества. Таким образом, ацетоновый и этилацетатные экстракты содержат более широкий спектр метаболитов, по сравнению с бутанольными. Проявление хроматограмм разными реагентами позволило определить присутствие в ацетоновом и этилацетатных экстрактах пептидных соединений и веществ класса макролидов, в этилацетатном экстракте - веществ класса хлорамфениколов. Также нужно отметить, что значительное количество веществ ацетонового и особенно этилацетатного экстрактов не разделяется и остается на линии старта. По всей видимости, это высокомолекулярные соединения, которые не могут быть разделены при ТСХ.

**Заключение.** Анализ экстрактов гомогената клеток и культуральной жидкости *Streptomyces zaomyceticus* GI01 с применением метода ВЭТСХ и сопоставление полученных результатов с данными об антимикробной активности исследованных экстрактов показал, что ингибирующий эффект эндо- и экзометаболитов штамма *Streptomyces zaomyceticus* GI01 в отношении изолятов микроорганизмов, ассоциированных с ВБРИ, вероятнее всего обусловлен веществами пептидной природы.

#### *Список литературы*

1. В. М. Свистушкин, Д. М. Мустафаев. Острые респираторные вирусные инфекции: принципы рациональной терапии. 2014; №26:1897.
2. О.А. Бургасова, Л.А. Краева. Оценка роли микроорганизмов респираторного тракта у больных с осложненным течением острых респираторных вирусных инфекций. 2014; 10: 276-280.
3. A. Matsumoto, Y. Takahashi. Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. 2017; 70: 514–519.
4. Хассан, Г.О.О. Антимикробный потенциал эндофитных актинобактерий лекарственных растений. 2017; №9(209): 106 – 110.

#### **Сведения об авторах:**

**Ягудина И.Р.**, студент кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, тел. +7(843) 337884 e-mail: [ilyuza.yagudina@mail.ru](mailto:ilyuza.yagudina@mail.ru)

**Карамова Н.С.**, доцент кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, кандидат биологических наук, доцент 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, тел. +7(843) 337884 e-mail: [nskaramova@mail.ru](mailto:nskaramova@mail.ru)



**Хабибрахманова В.Р.**, доцент кафедры «Пищевой биотехнологии» Казанского национального исследовательского технологического университета, 420015, Россия, г. Казань, К.Маркса, 68.

## СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ МИКРОРНК ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ

*Рустямова Р.С.<sup>1</sup>, Лернер Д.Д.<sup>2</sup>, Кравцова О.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии, ИФМиБ, КФУ, Казань

<sup>2</sup> 1-е кардиологическое отделение, МСЧ КФУ, Казань

89872198227, [rustyamova.regina@mail.ru](mailto:rustyamova.regina@mail.ru)

**Введение.** На сегодняшний день в медицинской практике широко применяются молекулярно-генетические методы исследования, которые позволяют своевременно диагностировать различные заболевания и прогнозировать характер их течения. Одними из таких молекулярных маркеров могут являться молекулы микроРНК, которые, как известно, обладают уникальной способностью модулировать огромную и сложную регуляторную сеть экспрессии генов в широком спектре процессов развития организма, включая клеточную пролиферацию, клеточную дифференцировку, метаболизм, апоптоз, секрецию белка и многих других [1].

Выделение микроРНК является ключевым моментом в ходе анализа их экспрессии. В комплексе с микроРНК могут присутствовать белки, липидные комплексы и другие примеси, которые могут оказывать негативное влияние на последующие этапы ПЦР-анализа [2]. В связи с этим, выбор оптимального метода выделения микроРНК является крайне актуальной задачей.

Таким образом, целью данного исследования явилась сравнительная характеристика методов выделения микроРНК из плазмы крови и выбор оптимального протокола для последующего ПЦР-анализа.

**Материалы и методы:** Выделение микроРНК проводили из 200 мкл плазмы периферической венозной крови, полученных от 5 добровольцев.

В работе использовано 5 методов выделения микроРНК:

- Коммерческий набор mirVana™ miRNA Isolation Kit (Applied Biosystems)
- Коммерческий реагент Extract RNA (Евроген)
- Лизирующий буфер на основе роданистого гуанидина с последующей очисткой и концентрированием на спин-колонках
- Лизирующий буфер на основе роданистого гуанидина без дополнительной очистки на спин-колонках
- Лизирующий буфер на основе гуанидинизотиоцианата.

После выделения микроРНК, проводили реакцию обратной транскрипции с использованием коммерческого набора реагентов TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции фирмы-производителя. Оценку экспрессии микроРНК-590 проводили методом ПЦР в реальном времени (CFX96, BioRad) на основе TaqMan-технологии с использованием коммерческой смеси праймеров и зондов (кат. № 478367\_mir, краситель - FAM, Applied Biosystems). Эффективность ПЦР оценивали на основе показателей C<sub>q</sub>.

**Результаты.** В ходе анализа по показателям Cq выявлено, что наименьшие циклы наблюдаются для образцов микроРНК, выделенных коммерческим набором mirVana и с использованием лизирующего буфера на основе гуанидина роданистого с последующей очисткой на твердофазном носителе (спин-колонке). Остальные методы не отличались особой эффективностью, т.к. пересечение базовой линии наблюдалось на гораздо более поздних циклах амплификации (таблица 1).

*Таблица 1. Показатели Cq для анализируемых образцов*

Метод выделения микроРНК	Значение Cq
mirVana™ miRNA Isolation Kit	27,51-29,61
Extract RNA	36,19 -37,76
Лизирующий буфер на основе роданистого гуанидина с последующей очисткой и концентрированием на спин-колонках	28,84-33,31
Лизирующий буфер на основе роданистого гуанидина без дополнительной очистки на спин-колонках	32,68-38,14
Лизирующий буфер на основе гуанидинизотиоцианата	38,05-43,77

**Обсуждение.** Прорывом в науке XX века стало открытие микроРНК и их активное изучение, как в качестве регуляторов экспрессии белков, так и в качестве перспективных начальных биомаркеров заболеваний и потенциальных мишеней для разработки лекарственных средств [3].

МикроРНК – небольшие молекулы РНК, которые могут быть утеряны при традиционных методах выделения РНК. Наиболее эффективным и достаточно простым способом выделения микроРНК из плазмы крови, по результатам данного исследования, является метод с использованием роданистого гуанидина с последующей очисткой на спин-колонках. В составе лизирующего буфера также входят соли роданистого аммония, ацетата натрия и глицерол, которые, видимо, способствуют сохранению целостности столь малых молекул.

**Заключение.** Получение качественных образцов микроРНК является ключевым этапом в их анализе. Несмотря на многочисленные методы выделения микроРНК, универсального все же не существует, так как многие из них имеют ряд существенных недостатков: сложность в выполнении процедуры, высокое качество реагентов и их дороговизна, чувствительность метода, частичная потеря микроРНК и т.д.

Поэтому оптимизация условий выделения микроРНК для каждого отдельного эксперимента является необходимым условием.

*Список литературы*

1. Е.А. Лехнов, П. П. Лактионов, Е.С. Морозкин и др. Способ выделения микроРНК из биологических жидкостей. Патент РФ № RU2585232C1 27.05.2016
2. A.V.Orang, R. Safaralizadeh , M. Kazemzadeh-Bavili. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. International Journal of Genomics.2014. ID 970607
3. U. Schotten, S. Verheule, F. Kirchhof, A. Goette. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a transla-tional appraisal.Physiol.Rev.2011;91 (1):265–325.

## ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

С.Н. Абрамов, Ю.В. Скибо, А.Р. Фатхуллина, Э.М. Биктагирова, З.И. Абрамова

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

[yuliya\\_ksu@mail.ru](mailto:yuliya_ksu@mail.ru) , +79888336680

**Введение.** Системная красная волчанка (СКВ) является клинически и серологически разнообразным аутоиммунным заболеванием неизвестной этиологии. Оно характеризуется наличием аутоантител, прежде всего к ядерному материалу клетки, и отложением иммунных комплексов в различных тканях [1]. Как и при всех аутоиммунных заболеваниях, потеря толерантности как Т-, так и В-клеток играет значительную роль в патогенезе СКВ. Недавние исследования, посвященные иммунопатогенезу заболевания, позволяют предположить, что некоторые пациенты имеют генетическую предрасположенность к потере толерантности к аутоантигенам (нарушенная иммунорегуляция Т-клеток), что вызывает повышенное производство аутоантител, ответственных за разрушение тканей и органов (аутореактивные В-лимфоциты) [2]. Т-клетки пациентов с СКВ проявляют многочисленные фенотипические и количественные нарушения, способствуя тем самым патогенезу СКВ. Среди популяции Т-клеток особое значение в патогенезе СКВ имеют: Т-хелперные клетки типа 1 (Th1), Т-хелперные клетки типа 2 (Th2), клетки Th17, фолликулярные Т-клетки (Tfh) и Т-регуляторные (Treg) клетки. Таким образом, **целью данного исследования** стало изучение субпопуляционного состава основных клеточных популяций в периферической крови больных системной красной волчанкой.

**Материалы и методы.** *Объектом изучения* стала периферическая кровь больных СКВ. Была отобрана группа из 15 пациентов, которые соответствовали 4 или более критериям классификации ACR для СКВ от Американской Коллегии Ревматологов [3]. Клинические данные, включая возраст, пол, длительность заболевания, вредные привычки, данные ACR и критерии по классификации системной волчанки Международного союза клиницистов (SLICC), индекс повреждений по SLICC/ACR (SLICC DI), серьезные сердечные нарушения (инфаркт миокарда, инсульт, или транзиторная ишемическая атака), болезнь Рейно, а также результаты иммунологического анализа аутоантител были получены из медицинских записей. Для контроля была набрана группа из 17 здоровых доноров, которые не имели признаков заболевания.

*Фенотипирование лимфоцитов периферической крови методом проточной цитометрии.* Популяции лимфоцитов были проанализированы на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с применением программных обеспечений CellQuest и MultiSet (Becton Dickinson). Для исследований брали по 50 мкл цельной крови с антикоагулянтом. Окрашивание клеток проводили с использованием комбинаций двух-, четырехцветных моноклональных антител поставляемых в наборе MultiTEST IMK (Becton Dickinson): CD3+; CD8+; CD45+; CD4+ и CD3+; CD16 +; CD56+; CD45+; CD19+ в течение 15 минут в темноте в соответствии с протоколом. Статистический анализ данных. Обработку результатов проводили в статистической среде R. Для представления данных использовали боксплоты. Две группы сравнивали с использованием критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при значениях двустороннего  $p < 0,05$ .

**Результаты.** На первом этапе исследования, мы определили содержание Т-клеток в периферической крови больных СКВ и здоровых доноров. Результаты показали, что суммарное количество CD3+ позитивных Т-лимфоцитов во всех исследуемых группах статистически не различалось (Табл. 1). В случае клеточно-опосредованного иммунного ответа главная роль принадлежит CD8+ Т-лимфоцитам и натуральным киллерам (НК). Мы показали, что в группе больных СКВ содержание CD8+ Т-клеток выше по сравнению с группой контроля. В то время как количество НК клеток у больных СКВ ниже. Снижено также содержание CD4+ Т-клеток по сравнению с контрольной группой.

Относительные значения активированных Т-клеток (CD3HLA-DR+), В-лимфоцитов (CD19+) и регуляторных Т-клеток (Treg) были значительно выше в группе СКВ, чем в контрольной группе. Для других исследуемых клеточных популяций первый критерий Стьюдента для независимых выборок не показал какой-либо статистической значимости при сравнении средних значений анализируемых групп.

**Таблица 1.** Относительное содержание субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови больных СКВ и здоровых доноров.

	Группы	
	СКВ	Контроль
CD3(%)	78,56±7,48	78,28±9,21
CD4(%)	38,71±9,71	40,34±8,52
CD8(%)	32,29±7,26	29,48±5,51
CD3HLA-DR(%)	17,34±4,82	10,31±3,81
CD19(%)	12,27±3,31	10,48±2,13
NK(%)	11,81±1,85	13,13±4,27
Treg(%)	9,31±2,63	7,82±0,55

На следующем этапе мы провели сравнительный анализ содержания лимфоцитов у больных с активной и неактивной формой заболевания (Таблица II). Не было выявлено значимых различий в CD3, CD3HLA-DR+ и НК клетках. Повышенное содержание CD4 и Treg установлено в группе с неактивной формой заболевания, а в группе с активной формой - CD8 и В-лимфоцитов (CD19).

**Таблица 2.** Относительное содержание субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови больных СКВ с активной и неактивной формой

	Формы СКВ	
	Активная	Неактивная
CD3(%)	78,31±6,98	78,88±8,26
CD4(%)	37,23±9,31	40,02±6,56
CD8(%)	33,29±5,82	31,86±6,14
CD3HLA-DR(%)	17,85±3,38	17,16±3,81
CD19(%)	13,17±2,29	11,48±2,51
NK(%)	11,72±2,81	11,95±2,47
Treg(%)	7,49±0,63	11,61±2,17

**Заключение.** Полученные результаты позволяют предположить, что увеличение относительного числа активированных Т-клеток, Treg, а также В-лимфоцитов у больных СКВ по сравнению со здоровыми донорами могут быть связаны с патогенезом заболевания. Эти параметры, как биомаркеры, позволяют дифференцировать пациентов с волчанкой.

Мониторинг субпопуляций иммунных клеток в периферической крови с помощью проточной цитометрии дает представление об аномальной функции Т и В клеток у больных СКВ. Необходимо проведение дальнейших исследований, чтобы объяснить роль и клиническую значимость лимфоцитов в патогенезе СКВ.

#### *Список литературы*

1. Choi J., Kim S.T., Craft J. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Immunol.* 2012; 24: 651–657.
2. Deng Y., Tsao B.P. Advances in lupus genetics and epigenetics. *Curr Opin Rheumatol.* 2014; 26: 482–492.
3. Е. И. Алексеева, Т. М. Дворяковская, И. П. Никишина, Р. В. Денисова, Н.С. Подчерняева, О. А. Сухоруких, Л. С. Шубина. Системная красная волчанка: клинические рекомендации. Часть 1. Вопросы современной педиатрии. 2018; 17; 1: 19–37.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № [18-34-00739](#).*

## **ОПТИМИЗАЦИЯ ТАРГЕТНОГО МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАБОЛИТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ЧЕЛОВЕКА**

Муллахметова А. Ф., Сынбулатова Г. Э., Нигматуллина Л. Ш., Романова Ю. Д., Лайков А.В., Лопухов Л.В., Салафутдинов И. И., Ризванов А.А.

Междисциплинарный центр протеомных исследований, ИФМиБ, КФУ

[mullahmetovaadela@gmail.com](mailto:mullahmetovaadela@gmail.com)

### **Введение**

Метаболом представляет собой пул низкомолекулярных эндогенных и экзогенных соединений (метаболитов) обычно массой до 1500 Da, которые образуются в результате функционирования биологических систем (клетки, ткани, органы, или целые организмы) в конкретный период времени. Метаболиты формируют широкую сеть взаимно превращающихся метаболических реакций в которых продукты одной ферментативной реакции являются входными субстратами для других реакций. В связи с этим, метаболом гораздо более динамичен по сравнению с протеомом и транскриптомом. Из-за чрезвычайной сложности и неоднородности метаболома и необходимости оценки аналитов отличающихся размерами, полярностью и концентрацией в настоящее время в метаболомике используются три типа платформ: газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГХ-МС), жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (ЖХ-МС) и ядерный магнитный резонанс (ЯМР).

Метаболомика все чаще используется для систематической и функциональной характеристики живых систем и может выступать в качестве инструмента оценки мгновенных, долгосрочных физиологических и патологических изменений в исследуемом объекте. В последние десятилетия метаболомика применяется для выявления клинических биомаркеров различных заболеваний, а также для определения потенциальных

терапевтических мишеней. При этом отдельные метаболомные маркеры на протяжении десятилетий используются для характеристики врожденных и приобретенных нарушений обмена веществ, анализ которых осуществляется с привлечением платформ базирующихся на ЖХ-МС.

Очевидно, что существует необходимость качественного и количественного определения широкого спектра метаболитов относящихся к различным группам веществ в одном отдельном эксперименте. В связи с этим, целью данного исследования было - оптимизировать метод одновременного определения содержания широкого спектра метаболитов, в образцах сыворотки и плазмы крови человека, и провести оценку содержания исследуемых метаболитов в с помощью созданного метода.

**Материалы и методы.** Стандарты анализируемых веществ были закуплены у компаний Sigma и TRC. Образцы крови от здоровых доноров отбирали в вакутейнеры с содержащие ЭДТА (плазма) или в пробирки без наполнителя (сыворотка). Пробирки центрифугировали. Для экстракции метаболитов, плазму и сыворотку смешивали с раствором (ацетонитрил:метанол:вода 2:2:1), пробирки центрифугировали, отбирали метанольный экстракт аликвоты до анализа хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Анализ экстрактов проводили с использованием ВЭЖХ система Agilent 1260, совмещенной с тандемным тройным квадрупольным масс-спектрометром с линейной ионной ловушкой QTRAP 6500 plus (Sciex). Методология анализа базировалась на технологии мониторинга множественных реакций (Multiple Reaction Monitoring (MRM)).

## Результаты

Первоначальный этап исследования включал в себя подбор пар родительских и дочерних ионов для детектирования метаболитов в ходе целевого анализ на основе MRM. Для этого была подготовлена библиотека стандартов веществ. Стоковые вещества разбавляли в 1000 и более раз и заполняли полученным раствором газоплотный стеклянный шприц с лаеровским замком. После чего вещества вводили напрямую в масс-спектрометр Qtrap 6500 plus (Sciex) и регистрировали спектры родительского и дочерних ионов. Наблюдаемые массы родительских и дочерних ионов сравнивали с данными опорных статей [1,2]. При расхождении значений между полученными результатами и данными статьи, а также для веществ отсутствующих в опорных статьях пробу перекальвали и подбирали оптимальные значения массы фрагментов, энергию соударения (CE) и потенциал декластеризации (DP). Полученные данные по родительскому иону и его фрагментам сопоставляли со значениями доступными в открытых базах данных, в частности использовали Human Metabolome Database (HMDB) [3]. Для определения каждого вещества генерировали шесть переходов (родительский ион его дочерние ионы).

Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили с использованием системы ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity, комбинированной с масс-спектрометром Qtrap 6500 plus оснащенным источником ионизации электрораспылением Turbo V (Sciex). Образцы разделяли в ходе хроматографии с гидрофильным взаимодействием (HILIC) с применением колонки на основе полимера  $\text{NH}_2$  (4 мкм,  $250 \times 2$  мм) (Asahipak NH2P-40 2E, Shodex). Оптимальные условия хроматографического разделения были следующими: Подвижная фаза А: 95%  $\text{H}_2\text{O}$  с 20 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  и 5% ACN, pH 9,8. Подвижная фаза В: 100% ACN. Градиент составлял: 0-3,5 мин 95% В, 3,6-8 мин 85% В, 8,1-13 мин 75% В, 14-30 мин 0% В, 31-41 мин 95% В, остановка 46 мин. Скорость потока составляла 200 мкл/мин.

Обнаружение веществ проводили с использованием ионизации электроспреем (ESI) методом мониторинга множественных реакций (MRM) на основе подобранных переходов (пар родительских ионов и их дочерних фрагментов). Стандарты исследуемых веществ смешивали группами разделяли хроматографически. В одном запуске со стандартами также анализировали пулы сывороток и плазмы крови.

Полученные ионные хроматограммы просматривали с использованием программного пакета Analyst 1.6.1 (Sciex). Оценивали время выхода исследуемого вещества при закаливании стандартов и их смесей, а также присутствие исследуемых веществ в пулах плазмы и сыворотки. Затем отбирали наиболее воспроизводимые MRM переходы, оценивали форму и соответствие ее к форме кривой распределения Гаусса. Несколько пар ионов родительский-дочерние от каждого вещества, были выбраны для дальнейшего этапа оптимизации метода.

В целях отбора одной оптимальной пары родительский-дочерний ион, характеризующих присутствие в образце исследуемого аналита, а также для вторичной валидации MRM переходов было создано пять стоковых растворов по 60-100 веществ. Присутствие целевых аналитов в стоковых растворах, в плазме и сыворотке, а также воспроизводимость метода (переходов, времени удержания и др.) оценивали в ходе масс-спектрометрического анализа.

С помощью программного обеспечения Analyst 1.6.1. проводили сравнение интенсивностей полученных сигналов метаболитов в растворе и в образцах плазмы и сыворотки. Целью данного этапа было – выбрать оптимальный MRM переход, который имел бы достаточную для расчетов интенсивность сигнала в образцах, и не интерферировал с другими сигналами. Оптимальные MRM переходы и значения времен удержания анализируемых веществ были использованы для создания интегративного целевого хромато-масс-спектрометрического метода анализа.

**Обсуждение.** Оптимизированный нами метод позволяет проводить одномоментную оценку широкого спектра метаболитов (около 400) в крови (плазма, сыворотка) относящихся к различным классам веществ. Метод требует минимальной пробоподготовки, легко воспроизводим, и может использоваться как для качественного так количественного анализа метаболитов в широком диапазоне концентраций. В тоже время, стоит отметить, что ряд исследованных веществ экстрагированных из образцов крови представлены в нижнем пределе детекции, или не детектируются вовсе. Данный аспект очевидно потребует концентрации образца для количественного определения целевого аналита.

**Заключение.** В ходе исследования подобраны условия для проведения масс-спектрометрического анализа 400 метаболитов. Определены массы родительских и дочерних ионов, и параметры фрагментации метаболитов. Создан и оптимизирован метод хроматографического разделения исследуемых веществ. Проведена предварительная оценка содержания метаболитов и работоспособность метода в смесях плазмы и сыворотки крови. Метод может быть использован для мониторинга широкого спектра метаболитов при различных физиологических и патологических состояниях, а также для оценки влияния проводимой терапии. Метод позволяет проводить как качественную так и количественную оценку метаболитов, при необходимости дает возможность расширить перечень исследуемых аналитов и типы биологических образцов (моча, спинномозговая жидкость, ткани и др.).

## Список литературы

1. K. Li, J.C. Naviaux, A. T. Bright, L. Wang, R. K. Naviaux. A robust, single-injected method for targeted, broad-spectrum plasma metabolomics. *Metabolomics*. 2017; 13: 122.
2. Metabolic features of Gulf War illness  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6660083/#pone.0219531.s005>
3. Human Metabolome Database  
<http://www.hmdb.ca/>

## УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

*Ю.В. Скибо, А.Р. Фатхуллина, С.Н. Абрамов, Э.М. Биктагирова, З.И. Абрамова*

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

[yuliya\\_ksu@mail.ru](mailto:yuliya_ksu@mail.ru), +79888336680

**Введение.** Системная красная волчанка (СКВ) - это системное аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся продукцией антиядерных аутоантител и широким спектром клинических проявлений, затрагивающих практически все системы органов. Предполагается, что изменения в гомеостазе Т-лимфоцитов играют ключевую роль в патогенезе СКВ [1, 2]. Установлено, что апоптоз отвечает за поддержание гомеостаза периферических лимфоцитов, избегая нерегулируемой клональной экспансии аутореактивных иммунных клеток. Ранее была установлена аномальная гибель Т-лимфоцитов у пациентов с волчанкой [3]. Усиленный спонтанный апоптоз циркулирующих Т-клеток был связан с хронической лимфопенией и высвобождением аутоантигенов. Помимо решающей роли апоптоза, все больше доказательств появляется в пользу важности аутофагии в поддержании гомеостаза лимфоцитов. Поэтому целью представленной работы стал анализ ультраструктурных параметров Т-лимфоцитов периферической крови больных системной красной волчанкой.

**Материалы и методы.** В качестве объекта исследования были использованы Т-лимфоциты периферической крови здоровых доноров и больных системной красной волчанкой. Они соответствовали 4м или более критериям классификации ACR для СКВ от Американской Коллегии Ревматологов [3]. Клинические данные, включая возраст, пол, длительность заболевания, вредные привычки, данные ACR и критерии по классификации системной волчанки Международного союза клиницистов (SLICC), индекс повреждений по SLICC/ACR (SLICC DI), серьезные сердечные нарушения (инфаркт миокарда, инсульт, или транзиторная ишемическая атака), болезнь Рейно, а также результаты иммунологического анализа аутоантител были получены из медицинских записей. Для контроля была набрана группа из 10 здоровых доноров, которые не имели признаков заболевания.

**Выделение Т-лимфоцитов.** Лимфоциты выделяли по стандартной методике на градиенте плотности фиколл-урографин ( $\rho = 1,077$ ). Для получения популяции Т-лимфоцитов использовали метод иммуномагнитной сепарации (Dynabeads Untouched Human T cells, Dnal, Invitrogen).



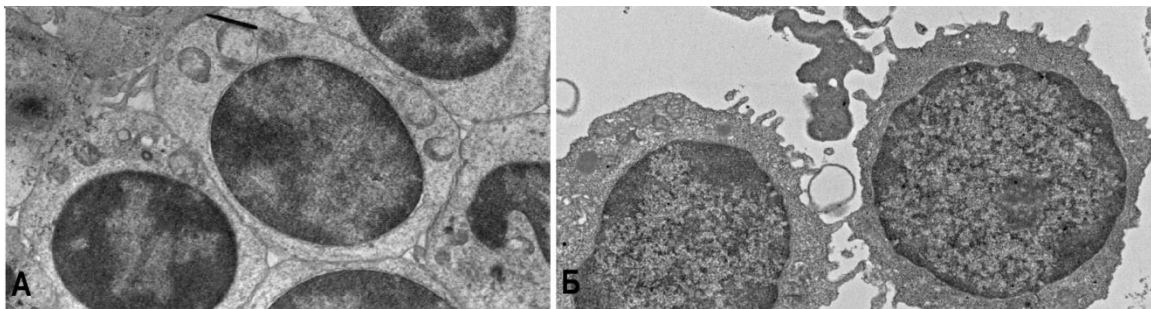
*Культивирование Т-лимфоцитов.* Т-лимфоциты инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (с 5 %-ным CO<sub>2</sub>) в питательной среде RPMI-1640, содержащей эмбриональную телячью сыворотку (10%), пенициллин/стрептомицин (5000 ед/мл/5000 мкг/мл) и L-глутамин (1%) в расчете 2×10<sup>6</sup> кл./мл.

*Ультраструктурная характеристика Т-лимфоцитов.* Клеточную суспензию центрифугировали в течение 10 мин 2000 rpm при +18°C (Eppendorf, 5810R), супернатант удаляли, а полученный осадок из Т-лимфоцитов фиксировали в 2,5 %-ном растворе глutarового альдегида (1 - 2 ч) и в 1 %-ном растворе OsO<sub>4</sub> (2 ч). Далее образцы дегидратировали в этаноле восходящей концентрации (30<sup>0</sup>, 40<sup>0</sup>, 50<sup>0</sup>, 60<sup>0</sup>, 70<sup>0</sup>, 96<sup>0</sup>), ацетоне и окиси пропилену. Материал заливали эпоксидной смолой Эпон – 812. Полимеризовали образцы в течение трёх суток в термостате при температуре 37, 45 и 60<sup>0</sup>С.

Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме "Ultratom III" (ЛКБ, Швеция). Срезы контрастировали уранил ацетатом и цитратом свинца. Препараты просматривались на электронном микроскопе Hitachi -125 (Япония).

**Результаты.** Используя метод трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) мы проанализировали микрофотографии свежевыделенных Т-лимфоцитов в различных группах.

На полученных микрофотографиях Т-лимфоцитов здоровых доноров клетки имеют правильную округлую форму (рис. 1, А). Клеточная мембрана ровная, без инвагинаций. Ядро, как правило, расположено центрально и занимает большую часть клетки: локализация хроматина периферическая, кариоплазма электронно-светлая. Все мембранные структуры целостны и хорошо прорисованы - митохондрии правильной формы с хорошо дифференцированными кристами. Чаще всего, скопления митохондрий наблюдаются медиально, недалеко от ядра. В цитоплазме различимы рибосомы, аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум. Наличие микроворсинок на поверхности плазматической мембраны свидетельствует об их функционально активном состоянии.

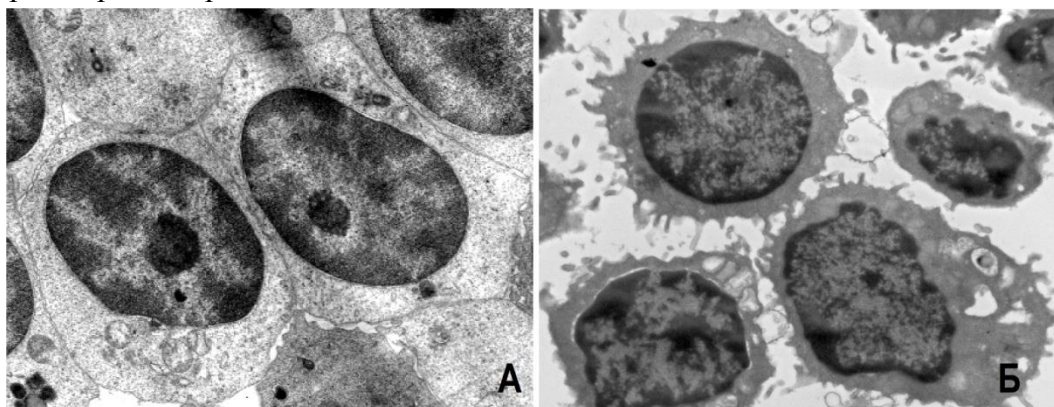


**Рисунок 1.** Микрофотографии свежевыделенных Т-лимфоцитов периферической крови здорового донора (А) и больного СКВ (Б). Микрофотография типичного Т-лимфоцита, полученная с помощью электронной микроскопии. Увеличение 5000 раз.

Большая часть Т-лимфоцитов больных СКВ обладает характерными морфологическими признаками Т-клеток, однако имеются незначительные морфологические отличия по сравнению с контрольной группой (рис. 1, Б). Для всех Т-лимфоцитов данной группы характерно наличие правильной овальной формы. Однако плазматическая мембрана, в отличие от контрольной группы, образует инвагинации. Ядра лимфоцитов, как и сами клетки, имеют овальную форму. Хроматин, в отличие от контрольной группы, конденсированный и расположен по периферии ядра. В цитоплазме различимы клеточные компоненты.

Затем мы провели морфологический анализ микрофотографий Т-лимфоцитов всех исследуемых групп на 3 сутки культивирования. В результате экспериментальных работ мы установили, что большая часть клеток здоровых доноров обладает морфологией, соответствующей апоптотическим изменениям на ранней стадии процесса. Аутофагосомы не были выявлены (рис. 2, А).

В группе больных СКВ наряду с нормальными клетками, встречаются Т-лимфоциты с морфологическими изменениями (рис. 2, Б). Обнаруживаются инвагинации ядерных мембран, изменения цитолеммы и поверхностных структур клетки, отсутствие микроворсинок и десмосом. Клеточная поверхность формирует многочисленные выросты, выявляются блеббинги. Отмечено наличие везикул с электронно-светлым содержимым, мультиламеллярных телец. Хроматин полностью конденсирован по периферии ядра. При этом обнаружены крупные аутофагосомы, внутри которых достаточно хорошо детерминированы различные клеточные компоненты.



**Рисунок 2.** Микрофотографии Т-лимфоцитов периферической крови здорового донора (А) и больного СКВ (Б) после 3 дней культивирования. Микрофотография типичного Т-лимфоцита, полученная с помощью электронной микроскопии. Увеличение 3000 раз.

**Закключение.** Проведенное исследование было посвящено изучению ультраструктурных параметров Т-лимфоцитов больных системной красной волчанкой до и после 3 дней культивирования. Анализ показал, что свежевыделенные клетки в основном имеют такую же морфологию, что и контрольные клетки. Однако стоит отметить наличие более конденсированного хроматина, что характерно для апоптотических клеток. В ответ на культивирование происходит усиление апоптотического процесса, а также стимулирование аутофагии (появление аутофагосом). Таким образом, можно заключить, что в группе с СКВ в ответ на стрессовые условия в Т-лимфоцитах усиливается апоптоз и активируется аутофагия. Для понимания механизмов, ответственных за одновременную активацию данных процессов необходимо проведение анализа ключевых белков-регуляторов. В целом, это исследование открывает новые перспективы для терапевтических стратегий, направленных на индукцию аутофагии.

#### *Список литературы*

1. Crispin J. C., Liossis S. N., Kis-Toth K., Lieberman L. A., Kyttaris V. C., Juang Y. T., Tsokos G. C. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol. Med.* 2010; 16: 47–57.
2. Moulton V. R., Tsokos G. C. Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 2011;13: 207.

3. Gaipf U. S., Munoz L. E., Grossmayer G., Lauber K., Franz S., Sarter K., Voll R. E., Winkler T., Kuhn A., Kalden J., Kern P., Herrmann M. Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J. Autoimmun.* 2007; 28: 114–121

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № [18-34-00739](#).*

## **ПОДАВЛЕНИЕ БИОСИНТЕЗА ХОЛЕСТЕРИНА В АСТРОЦИТАХ БЛОКИРУЕТ ПЕРЕДАЧУ СИГНАЛА SONIC HEDGEHOG В ГРАНУЛЯРНЫХ НЕЙРОНАЛЬНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКАХ МОЗЖЕЧКА**

Рената Гордон, Хайлонг Лиу, Чшанхай Фан, Цзенг-цжи Янг

[Renata.e.gordon@gmail.com](mailto:Renata.e.gordon@gmail.com)

Онкологический центр Фокс Чейз, Филадельфия, США

Взаимодействие между глиальными и нейрональными клетками необходимо для нормального развития и функционирования мозга. В развивающемся мозжечке глиальные клетки астроциты и гранулярные нейрональные предшественники (ГНП) активно пролиферируют под влиянием митогена Sonic Hedgehog (Shh). Развитие и рост мозжечка в ходе эмбриогенеза и раннего онтогенеза обусловлены пролиферацией астроцитов и ГНП. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе пролиферации данных типов клеток недостаточно определены. В настоящем исследовании были использованы мышинные модели, в астроцитах которых был удалён белок нестин. Нестин – структурный филамент, оказывающий влияние на передачу сигнала в каскаде Shh. Было обнаружено, что дефицит нестина подавлял передачу сигналов Shh в астроцитах и блокировал их пролиферацию. Удивительно, что пролиферация ГНП также была значительно сокращена в результате удаления нестина в астроцитах. Дальнейший анализ выявил заметное снижение уровня холестерина в ГНП в мозжечке после подавления экспрессии нестина. Также, снижение биосинтеза холестерина подавляло передачу сигнала в каскаде Shh. Дальнейшая генетическая блокировка биосинтеза холестерина в астроцитах привела к снижению уровня холестерина, а также к нарушенной пролиферации ГНП, что указывало на то, что ГНП получают холестерин от астроцитов. Эти результаты продемонстрировали критическую роль нестина в передаче сигналов Shh в астроцитах, а также показали, что холестерин играет неотъемлемую роль в пролиферации ГНП. Данное исследование указывает на роль межклеточных взаимодействий для поддержания гомеостаза холестерина, а также его влияние на развитие тканей головного мозга.

## Секция «Биохимия и молекулярная биология канцерогенеза»

### СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОНТЕЙНЕРЫ НА ПЛАТФОРМЕ ПИЛЛАР[5]АРЕНА, СОДЕРЖАЩИЕ ТЕРПЕНОИДНЫЙ ФРАГМЕНТ: НЕКОВАЛЕНТНАЯ САМОСБОРКА

Ахмедов А.А., Шурник Д.Н., Стойков И.И.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова.

[naive2294@gmail.com](mailto:naive2294@gmail.com), +79274232865

**Введение.** Онкологические заболевания представляют серьезную проблему для современного общества. Препараты, применяемые для химиотерапии, являются токсичными для быстро делящихся клеток, и часто возможны побочные эффекты, проявляющиеся в тех тканях, клетки которых быстрее обновляются [1]. Плохая растворимость низкомолекулярных противоопухолевых препаратов зачастую ограничивает попадание их в опухолевую ткань. Одним из способов обойти эти ограничения является инкапсулирование лекарственных препаратов в наноносителях, что может способствовать беспрепятственному транспорту препаратов к поражённым клеткам и тканям [2]. Объединение макроциклической платформы пиллар[5]арена и терпеноидных фрагментов позволит создать нанокapsулы способные к взаимодействию с противоопухолевыми препаратами.

**Материалы и методы.** На начальном этапе был синтезирован ряд меротерпеноидных производных, содержащих пиридиниевый фрагмент. Наличие пиридиниевого фрагмента позволит реализовать нековалентное взаимодействие с пиллар[5]ареном.

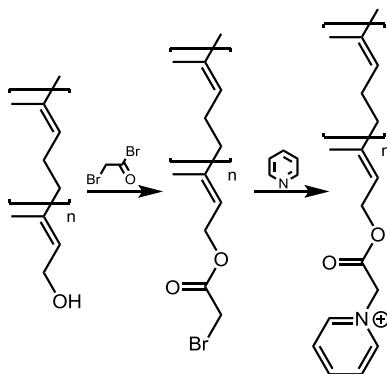


Схема 1. Синтез терпеноидной структуры с пиридиниевым фрагментом

Пиллар[5]арен, содержащий карбоксилатные фрагменты выступает в качестве хозяина, пиридиниевый фрагмент меротерпеноида выступает в качестве гостевой структуры. В ходе взаимодействия пиридиниевого фрагмента с пиллар[5]ареном образуется амфифильная супрамолекулярная структура, содержащая терпеноидный фрагмент, способная агрегации в нано-контейнеры.

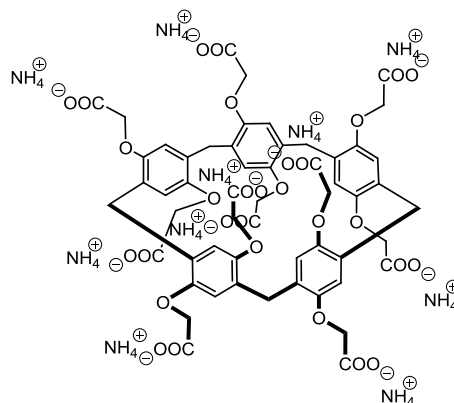


Схема 2. Предполагаемые структуры пиллар[5]аренов

Взаимодействие терпеноидов с пиллар[5]ареном подтверждено методом ЯМР-титрования и УФ-спектроскопии. Образование ассоциатов супрамолекулярных амфифилов исследовалось методом динамического светорассеяния.

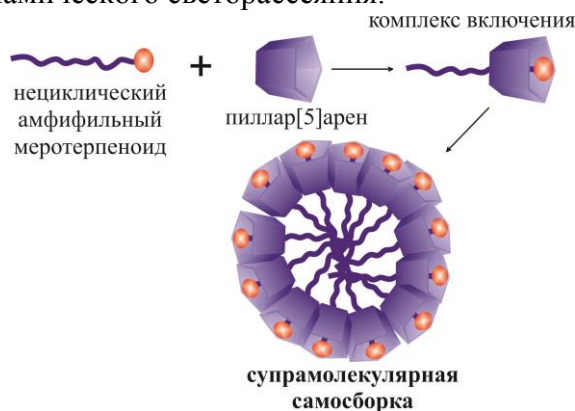


Рисунок 1. Модель супрамолекулярной самосборки нековалентно собранных комплексов пиллар[5]арен/меротерпеноид.

**Результаты.** В ходе ЯМР-титрования было изучено взаимодействия меротерпеноидов с карбоксилатным пиллар[5]ареном. Сигналы протонов соответствующие фрагменту пиридиния смещались в область более сильных полей вплоть до 0.2 м.д. Что говорит об экранировании пиридиниевого фрагмента полостью пиллар[5]арена. В ходе изучения смесей пиллар[5]арен/меротерпеноид методом УФ-спектроскопии наблюдался гипохромный эффект сигнала соответствующего пиридиниевому фрагменту, что говорит о взаимодействии последнего с пиллар[5]ареном. Изучение смесей пиллар[5]арен/меротерпеноид методом динамического светорассеяния показало наличие ассоциатов в растворах с концентрацией  $10^{-3} - 10^{-5}$  моль/л размером 100-200 нм и PDI = 0.15.

**Обсуждение.** Исследование комплексов пиллар[5]арена и различных меротерпеноидов рядом физических методов показало, что они вступают в нековалентное взаимодействие гость-хозяин. Образующиеся амфифильные супрамолекулярные комплексы собираются в наноразмерные агрегаты в водных растворах.

**Заключение.** Образующиеся нано-контейнеры могут быть использованы в капсулировании противоопухолевых препаратов. Карбоксилатный пиллар[5]арен будучи нетоксичной платформой является прекрасным кандидатом на роль гидрофильного фрагмента супрамолекулярного амфифила. Меротерпеноидные структуры являются биосовместимым и не вызовут негативной реакции организма.

### *Список литературы*

1. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: The Next Generation / D. Hanahan, R.A.Weinberg // Cell – V. 144, I. 5. – 2011 – P. 646-674.
2. Tran S. Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery / S. Tran, P.-J. DeGiovanni, B. Piel, P. Rai // Clinical and Translational Medicine 6:44. – 2017.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 19-33-90170)

## **РЕГИОНАРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МУТАЦИИ ГЕНА K-RAS ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ В РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН**

*Гатауллин Булат Ильгизович*

РКОД МЗ РТ, Институт фундаментальной медицины и биологии КФУ

[bulatg@list.ru](mailto:bulatg@list.ru), 89625533107

### **Материалы и методы**

В рамках исследования нами проанализированы данные о 654 пациентах с диагнозом КРР, находившихся на лечении РКОД МЗ РТ в 2013-2015 годах.

Пациентам был проведен генетический анализ на наличие мутации в гене K-RAS на материале, полученном в результате оперативного вмешательства.

### **Результаты**

Общая частота мутаций гена K-RAS составила 36,2%, что соответствует данным по России. Все мутации были исследованы в первичной опухоли. Чаще мутация возникала в 12 и 13 кодонах. У женщин частота мутаций гена K-RAS встречалась чаще 37,7%, чем у мужчин -20,3%. В отличии от других исследований мы отметили снижение частоты мутации гена K-RAS в более старших возрастных группах.- менее 10% в возрасте старше 60 лет.

Республика Татарстан имеет свои популяционные особенности. На ее территории проживают 2 титульные нации примерно в равной численности. Результаты наших исследований показали, что у пациентов русской национальности мутация гена K-RAS встречалась несколько чаще – в 39%, чем у татар-21%.

Среди опухолей с мутантным типом гена K-RAS чаще наблюдались опухоли в стадии T 4 – 35% чем при диком типе в 25%. пациентов имеющих регионарные метастазы мутации гена K-RAS встречались значительно чаще, -45,8% , чем при их отсутствии-4,9%. При наличии отдаленных метастазов мутации гена K-RAS была выявлена в трети наблюдений.

5-летняя выживаемость у женщин больных КРР не зависела от статуса гена K-ras , в то же время у мужчин при наличии мутантного гена она была на 14% меньше, чем при диком типе гена.

При анализе территориального распределения больных колоректальным раком, выявлено, что мутации в гене K-RAS значительно чаще встречались у пациентов проживающих в восточном закамье Республики.

## Обсуждение

Выявленная нами региональная специфика мутации гена K-Ras, позволит акцентировать внимание на особенностях диагностики, прогнозирования течения и исходов заболевания, в зависимости от статуса гена K-Ras.

### Заключение

1. Частота мутации гена K-Ras в Республике Татарстан при КРП составила 36,2%.
2. Наиболее часто мутацию гена K-Ras наблюдали в 12 кодоне ( 68% случаев)
3. Частота мутаций в опухолях у мужчин встречается реже чем у женщин.
4. У больных в группе до 50 лет наблюдается увеличение частоты мутаций гена K-RAS. Наибольшее количество пациентов с диким типом гена K-RAS, оказалось в группе старше 61 года.
5. Опухоли имеющие мутации гена K-RAS чаще метастазируют в регионарные лимфатические узлы и дают отдаленные метастазы .
6. Мутация гена K-ras в опухоли не влияет на 5-летнюю выживаемость у женщин, в то же время уменьшает ее у мужчин на 14%.
7. Мутация гена K-ras в опухоли значительно чаще встречалась у пациентов проживающих в экологически неблагоприятных регионах Татарстан.

### Список литературы

1. K-ras gene mutation as an early prognostic marker of colon cancer. Pol Przegl Chir. 2016 Jan 1;88(1):15-9. doi: 10.1515/pjs-2016-0021. Szpon Ł, Stal A, Zawadzki M, Lis-Nawara A, Kielan W, Grzebieniak Z.
- 2 K-ras mutations are correlated to lymph node metastasis and tumor stage, but not to the growth pattern of colon carcinoma. APMIS. 2012 Jun;120(6):459-68. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02852.x. Epub 2011 Dec 22. Mannan A1, Hahn-Strömberg V. Department of Laboratory Medicine, Section for Pathology, Örebro University Hospital, Sweden.
3. Histoprognotic markers role in colorectal cancer. . Rom J Morphol Embryol. 2016;57(2):445-50. Bădulescu F1, Mihai GM, Bădulescu A, Prejbeanu I. Department of Oncology, Faculty of Medicine, University of Medicine and Pharmacy of Craiova, Romania;
4. Association of KRAS gene mutations with depression in older metastatic colorectal cancer patients. Zhou Y1, Gu X2, Wen F3, Chen J4, Wei W4, Zhang ZH4, He Y3, Xie L1. Int Psychogeriatr. 2016 Dec;28(12):2019-2028. Epub 2016 Jul 29.

## ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ БЕЛКОВ MUSASHI2 И NEDD9 В РЕГУЛЯЦИИ ОТВЕТА НА ТАРГЕТНУЮ ТЕРАПИЮ ПРОТИВ РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ПРИ РАКЕ ЛЁГКОГО

*Денека А.Я., Тихомирова М.В., Серебрянский И.Г., Абрамова З.И., Бумбер Я.А.*

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет

[denekaalex@gmail.com](mailto:denekaalex@gmail.com) , +7(925)6073823

**Введение.** Смертность при заболевании немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) занимает лидирующее место среди онкологических заболеваний [1]. Таргетная терапия данного заболевания ингибиторами рецепторов с тирозин киназной активностью (таких, как, например, рецептор эпидермального фактора роста – EGFR) является одним из наиболее эффективных терапевтических подходов у пациентов, однако вторичная резистентность к

терапии наблюдается у подавляющего числа пациентов, поэтому исследование биологических механизмов патогенеза данного заболевания и поиск новых мишеней для таргетной терапии являются актуальными и востребованными задачами. Целью данного исследования являлась оценка роли белков NEDD9 и Musashi2 в качестве регуляторов ответа на терапию ингибиторами EGFR при НМРЛ.

NEDD9 является поддерживающим белком в сигнальных каскадах интегринов, киназ фокальной адгезии (ФАК) и SRC, а также рецепторов с тирозин киназной активностью [2, 3], таких как EGFR. Также NEDD9 способен стимулировать активность эффекторов EGFR – киназ АКТ и ERK1/2 [4]. EGFR, в свою очередь, способствует фосфорилированию NEDD9, усиливая его активность в регулировании клеточной миграции и инвазии [4]. Оба этих белка имеют несомненно важное трансляционное значение, так как мутации EGFR обнаруживаются в порядка 15-30% случаев НМРЛ, а повышенная экспрессия NEDD9 более чем в 30%.

**Материалы и методы.** В ходе работы над проектом была проведена работа с мышинной моделью, трансгенной по K-Ras/p53, с интактным (контроль) и «выключенным» Nedd9, а также со следующими клеточными линиями легочной аденокарциномы человека: H1299, H460 и A549. Был получен и накоплен опухолевых материал от мышей для дальнейших функциональных *in vitro* экспериментов: была проведена работа с образцами опухолевой ткани, полученными от трансгенных мышей - получены лизаты опухолевой ткани и проведен Вестерн блот анализ с целью определения уровней экспрессии белков NEDD9, Musashi2, EGFR. Данные, полученные от мышинной модели, были подтверждены в человеческих клеточных линиях аденокарциномы легкого.

**Результаты.** При исследовании роли NEDD9 в патогенезе НМРЛ с использованием мышинной модели нами было обнаружено, что нулевой генотип NEDD9 был связан с более быстрым ростом и инвазией опухолей в легких мышей. Также было обнаружено, что опухоли с «выключенным» NEDD9 обладали повышенными уровнями трансляционного регулятора Musashi2. Обратная зависимость в экспрессии NEDD9 и Musashi2 была подтверждена *in vitro* в человеческих клеточных линиях аденокарциномы легкого с помощью Вестерн блоттинга. При последующем анализе клеточных моделей НМРЛ с измененными уровнями Musashi2 мы обнаружили, что его уровни положительно коррелируют с уровнями EGFR. *In silico* исследование мРНК белка EGFR с целью поиска таргетных консенсусных последовательностей комплементарных доменам связывания с мРНК в Musashi2 показал, что мРНК EGFR является потенциальной мишенью Musashi2. Таким образом можно сделать вывод, что этот Musashi2 способен напрямую связываться с мРНК EGFR регулируя трансляцию этого белка. В настоящее время проводятся эксперименты с целью подтверждения данной гипотезы.

**Обсуждение.** Таким образом, на основании собственных результатов и данных литературы нами было сделано предположение, что отсутствие активности белка Nedd9 на ранних этапах развития опухоли, включая момент опухолевой трансформации клетки, приводит к компенсаторному перестроению внутриклеточных белковых сигнальных путей и в конечном итоге к более злокачественному прогрессированию заболевания. Уровни белка NEDD9 обратно пропорционально влияют на экспрессию белка Musashi2 – трансляционного регулятора, играющего важную роль в метастазировании опухолевых клеток НМРЛ [5]. Ранее полученные нами данные указывают на то, что Musashi2 выборочно необходим для жизнеспособности клеток EGFR-мутантного НМРЛ. Учитывая вышеизложенное,



представляется возможным сделать вывод о том, что статус активности поддерживающего белка NEDD9 способен модулировать активность EGFR опосредованно за счет Musashi2 и таким образом потенциально оказывать влияние на чувствительность к ингибиторам EGFR в некоторых типах клеток аденокарциномы легкого.

**Заключение.** Суммируя всё выше сказанное, можно сделать вывод о том, что белок NEDD9 способен влиять на экспрессию Musashi2, а последний, в свою очередь, регулировать активность EGFR. Эти белок-белковые взаимодействия играют потенциально важную роль в контексте EGFR-мутантного HMPJ, так как NEDD9-MSI2 могут служить новыми белками-модуляторами ответа на таргетную терапию EGFR.

#### *Список литературы*

1. N.A. Howlader, M. Krapcho, D. Miller, K. Bishop, S.F. Altekruse, C.L. Kosary, Y.M. Ruhl, Z. Tatalovich, A. Mariotto, D.R. Lewis, H.S. Chen, E.J. Feuer, K.A. Cronin. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013. National Cancer Institute. Bethesda, MD. 2013. Электронный ресурс режим доступа URL: [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2013/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/) (От ноября 2015, данные исследования SEER, опубликованы в апреле 2016. April).

2. Feng Y, Wang Y, Wang Z, Fang Z, Li F, Gao Y, [et al.] The CRTCl-NEDD9 signaling axis mediates lung cancer progression caused by LKB1 loss // Cancer research. – 2012. – Vol 72. – N. 24. – P. 6502-11.

3. M.K. Singh, D. Dadke, E. Nicolas, I.G. Serebriiskii, S. Apostolou, A. Canutescu, E.A. Golemis. A novel Cas family member, HEPL, regulates FAK and cell spreading. Molecular biology of the cell. 2008; 19 (4): 1627-36.

4. I. Astsaturov, E.A. Golemis et al. Synthetic lethal screen of an EGFR-centered network to improve targeted therapies. Sci Signal. 2010; 3(140): 67.

5. A.E. Kudinov, A.Y. Deneka, E.A. Golemis, Y. Boumber et al. Musashi-2 (MSI2) supports TGF-beta signaling and inhibits claudins to promote non-small cell lung cancer (NSCLC) metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016; 113(25): 6955-60.

*Часть работы выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00307*

## **ХАРАКТЕРИСТИКА ВЛИЯНИЯ БИНАЗЫ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И СПОСОБНОСТЬ К ИНВАЗИИ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ КИШЕЧНИКА**

*Зелинская Александра Юрьевна, Зеленихин Павел Валерьевич*

КФУ, ИФМиБ, кафедра микробиологии

+ 79869179311, [alzelinskaya98@gmail.com](mailto:alzelinskaya98@gmail.com)

### **Введение**

Современные методы лечения злокачественных заболеваний обычно представляют собой сочетание хирургического вмешательства с высокодозной химиотерапией, обладающей массой недостатков. В связи с чем возникает необходимость поиска альтернативных по возможности щадящих вариантов терапии. Одним из перспективных

направлений является использование цитотоксичных рибонуклеаз микроорганизмов, в том числе биназы – РНКазы *Bacillus pumilus*.

Целью настоящей работы являлась характеристика влияния биназы на жизнеспособность и способность к инвазии клеток карциномы кишечника HuTu 80.

#### Материалы и методы

В исследовании была использована перевиваемая линия культуры клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека – HuTu 80 в условиях *in vitro*. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 15% эмбриональной сыворотки телят, а также 2мМ глутамина, пенициллин и стрептомицин (по 100 ед/мл), при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Анализ апоптоз-индуцирующей активности биназы осуществляли при помощи метода проточной цитофлуориметрии при окрашивании флуоресцентным красителем мероцианином 540 с использованием проточного цитофлуориметра FACSCanto II (BD, США). Обработку результатов проводили с помощью программы FACSDiva Software. Способность биназы блокировать миграцию клеток оценивали методом повреждающего штриха (scratch-wound assay), изображения фиксировали при помощи фазово-контрастного микроскопа Axio observer A1 (Zeiss, Австрия) сразу после нанесения штрихов и по истечении 24 ч и 48 ч инкубирования.

#### Результаты и обсуждение

1) Результаты оценки антиинвазивного действия РНКазы *Bacillus pumilus* на клетки линии HuTu 80 представлены в таблице 1 и на рисунке 1.

Таблица 1 - Антиинвазивная активность биназы в отношении клеток HuTu 80. За 100% принята площадь штриха сразу после нанесения.

Концентрация биназы, мкг/мл	Площадь повреждающего штриха, %*	
	24 ч	48 ч
0	35,5	15,7
10	54,3	21
50	60	33,8
100	71,4	54,7
300	90	-

\* - за 100% принимали площадь штриха сразу после нанесения.

Как видно из представленных данных, биназа проявляет концентрационно-зависимую способность подавлять миграцию клеток HuTu 80. В концентрации 300 мкг/мл после 48 ч инкубирования влияние биназы на миграцию клеток оценить было невозможно в связи с их массовой гибелью.

Таким образом, установлено антиинвазивное действие биназы на клетки HuTu 80 в диапазоне концентраций 10 мкг/мл – 300 мкг/мл. Известно, что данная РНКаза обладает способностью подавлять миграцию злокачественных клеток, в частности эпителия легких, экспрессирующих *gas*-онкоген [1].

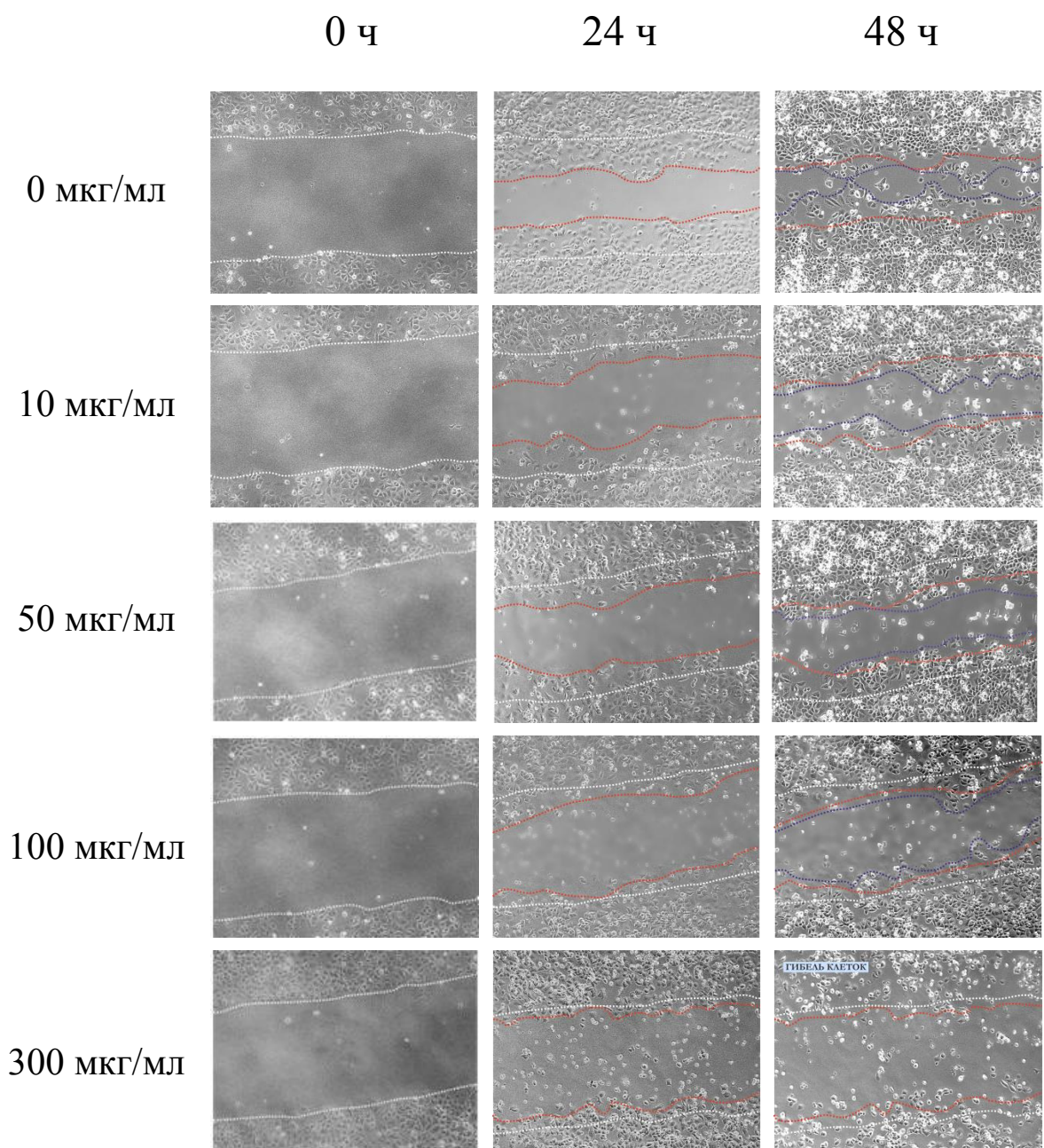


Рисунок 1- Влияние биназы на инвазивные свойства клеток Hutu 80.

2) Результаты цитометрической характеристики апоптозиндуцирующего действия РНКазы *Bacillus pumilus* на клетки линии Hutu 80 отражены в таблице 2

Таблица 2 - Апоптозиндуцирующая активность биназы в отношении клеток Hutu 80

Концентрация биназы, мкг/мл	Доля живых клеток, %	
	24 ч	48 ч
0	97,2	79,9
100	90	25,1
300	75,2	4,7

Как видно из таблицы 2, апоптозиндуцирующая активность РНКазы *Bacillus pumilus* в отношении линии клеток аденокарциномы кишечника человека Hutu 80 возрастает с увеличением ее концентрации и времени инкубирования. Полученные результаты позволяют заключить, что биназа обладает сильным апоптозиндуцирующим действием в отношении клеток Hutu 80. Подобное действие было продемонстрировано ранее в отношении спектра линий злокачественных клеток, включая опухоли молочной железы [2] и легких [3].

### **Заключение**

1) Охарактеризована способность биназы ограничивать скорость клеточной миграции клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека Hutu 80 с использованием метода повреждающего штриха (scratch-wound assay). Биназа значительно снижала инвазивную активность клеток в концентрациях 10 мкг/мл – 300 мкг/мл.

2) Выявлено значительное концентрационно-зависимое апоптозиндуцирующее действие биназы на клетки линии Hutu 80. Максимальная индукция апоптоза наблюдалась через 48 ч инкубации с 300 мкг/мл фермента; доля апоптотических клеток в популяции в данных условиях достигла 95.3%.

### *Список литературы*

1. O.N. Ilinskaya, I. Singh, E. Dudkina, V. Ulyanova, A. Kayumov, G. Barreto. Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase). *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016; 1863: 1559-1567.

2. P.V. Zelenikhin, V. Pukhovskaya, A. Garipov, A. Makeeva, E. Sokolova, O. Ilinskaya. Obvious and Hidden Reasons of Breast Cancer Cell Sensitivity to Antitumor RNase. *BioNanoScience*. 2016b; 6: 528-533.

3. P. V. Zelenikhin, A. V. Makeeva, T. Nguen, O. N. Ilinskaya The combined action of binase and bleomycin on human lung adenocarcinoma cells. P. V. Zelenikhin. *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem*. 2016a; 10: 87-90.

## **ПОЛУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РИБОНУКЛЕАЗЕ (БИНАЗЕ)**

*Калашников В.А.*

Казанский федеральный университет  
[icebuldogq@gmail.com](mailto:icebuldogq@gmail.com), 89869126515

**Введение.** Одной из важнейших задач биомедицины является поиск противоопухолевых соединений, отличающихся высокой селективностью в отношении малигнизированных клеток, а так же низкой иммуногенностью. Особое внимание исследователей привлекают бактериальные ферменты класса гидролаз – рибонуклеазы (РНКазы). К существенным преимуществам РНКаз как противоопухолевых агентов следует отнести их способность индуцировать клеточную гибель с помощью апоптоза [1]. На сегодняшний день известно несколько микробных рибонуклеаз, обладающих селективным цитотоксическим действием по отношению к раковым клеткам. Одна из них рибонуклеаза *Bacillus pumilus* 7P – биназа является представителем семейства гуанилспецифичных рибонуклеаз семейства N1/T1. Биназа обладает селективной цитотоксичностью по отношению к малигнизированным клеткам, экспрессирующим спектр определенных

онкогенов, таких как *kit*, *ras*, AML-ETO, FLT3 [2]. Однако точный молекулярный механизм противоопухолевого действия биназы пока не установлен. Изучение молекулярных механизмов взаимодействия фермента с внутриклеточными компонентами представляет важный аспект исследования. В связи с этим необходимо создать эффективную тест-систему для идентификации биназы и ее комплексов с помощью иммунохимических методов.

Целью данной работы было получение специфических антител к бактериальной рибонуклеазе. *Bacillus pumilus* 7P (биназе).

**Материалы и методы.** Для получения поликлональных антител к биназе кроликов иммунизировали препаратом фермента, представляющим собой белок со степенью чистоты 95%. Курс иммунизации состоял из 4 подкожных инъекций с интервалом 10 дней смесью возрастающих (1, 2, 4, 8 мг) концентраций белка и адьюванта Фрейнда. Для ревакцинации через 21 день животным подкожно вводили 10мг растворимого белка. Кроличью сыворотку получали через 10 дней после ревакцинации использовали для иммунохимического анализа. Специфичность полученной сыворотки была подтверждена при постановке реакции двумерной иммунодиффузии в агаровом геле с препаратами гомогенной биназы и ее комплекса с ингибитором барстаром. Комплекс «биназа– барстар» получали *in vitro*; степень ингибирования ферментативной активности комплекса контролировали по уровню РНКазной активности, определяемой по количеству кислоторастворимых продуктов гидролиза РНК.

С целью повышения чувствительности иммунохимического анализа специфические антитела из сыворотки выделяли с помощью аффинного сорбента на основе CNBr–активированной сефарозы 4. В качестве лиганда использовали биназу. Очищенные антитела были использованы для постановки иммуноблоттинга.

Клеточные лизаты были получены с помощью коммерческого набора Abscam (Великобритания) ab206996.

**Результаты.** С учетом динамики антителообразования разработана схема иммунизации кроликов и получена специфическая поликлональная сыворотка к биназе. Оптимизированы условия проведения иммунохимического анализа и продемонстрирована возможность ее использования для идентификации гомогенной РНКазы и рибонуклеазы в составе комплекса «биназа-барстар». Методом аффинной хроматографии были выделены антитела к биназе, которые эффективно детектировали биназу в концентрации 1-5 мкг при постановке иммуноблоттинга. Кроме того, было установлено, что с помощью очищенных антител можно тестировать инактивированную биназу, т.е. лишенную ферментативной активности за счет мутации в активном центре фермента (His101-Glu101). Дальнейшие эксперименты продемонстрировали возможность специфических антител к биназе выявлять гомогенный белок в составе лизатов клеток аденокарциномы легкого человека A549, ранее обработанных биназой в концентрации 20 мкг.

**Обсуждение.** Бактериальная рибонуклеаза – биназа обладает противоопухолевыми и противовирусными свойствами, что позволяет рассматривать ее как потенциальный терапевтический препарат [3], [4]. Поэтому изучение структуры, функций и молекулярных механизмов взаимодействия фермента с внутриклеточными компонентами представляет важный аспект исследования. В подобных экспериментах для исследования макромолекул, прежде всего белков, используются специфические антитела. Антитела – незаменимый инструмент для исследования макромолекул, прежде всего белков, в биологическом эксперименте, медицинской диагностике и терапии. Антитела обладают высокой

специфичностью и поэтому могут использоваться для идентификации соответствующего антигена в сложных биологических смесях на основе его структуры, а не биологической активности. С этой целью нами получена специфическая поликлональная кроличья сыворотка и выделена фракция, очищенных с помощью аффинного сорбента, антител к биназе.

Ранее в экспериментах *in vitro* показано, что активность биназы ингибируется при добавлении в реакционную смесь барстара, ингибитора структурного гомолога биназы – барназы [5]. Следовательно, барстар взаимодействует с активным центром биназы и блокирует ее каталитическую активность. Это позволило нам в дальнейших экспериментах использовать барстар в качестве модельного белка и доказать взаимодействие специфических антител с биназой в составе комплекса с другим белком. Результаты иммуноблоттинга подтвердили возможность детекции инактивированной биназы с помощью очищенных антител.

Существенным результатом наших исследований является подтверждение взаимодействия специфических антител к биназе с гомогенным белком в составе лизатов клеток аденокарциномы легкого человека A549, предварительно обработанных биназой. Это позволяет использовать полученные антитела в качестве эффективной тест системы для выявления, как поверхностных рецепторов, так и внутриклеточных мишеней, взаимодействующих с исследуемым белком, что чрезвычайно важно для установления механизма его действия.

**Заключение.** Выделенные из специфической кроличьей сыворотки с помощью аффинного сорбента антитела к биназе, обладающей селективной цитотоксичностью по отношению к малигнизированным клеткам, в дальнейшем будут использованы для выяснения механизма цитотоксического действия биназы на опухолевые клетки.

#### *Список литературы*

1. V. A. Mitkevich, O. N., Iinskaya, A. A. Makarov. Antitumor RNases: killer's secrets. Cell cycle. 2015; 14: 931–932.
2. V. A. Mitkevich, A. A. Makarov, O. N., Iinskaya. Cell targets of antitumor ribonucleases. Molecular Biology. 2014; 48:181-188.
3. О.Н. Ильинская, А.А. Макаров. Почему рибонуклеазы вызывают гибель раковых клеток. Мол.биол. 2005; 39: 1–11.
4. Р. Шах Махмуд, О. Н. Ильинская. Противовирусная активность биназы в отношении вируса пандемического гриппа А (H1N1). Actanaturae. 2013; 5: 49 – 56.
5. G. I. Yakovlev, G. P. Moiseyev, N. K. Struminskaya, O.A. Borzykha, L.V. Kipenskaya, L.V. Znamenskaya, I.B. Leschinskaya, E.B. Chernokalskaya, R.W. Hartley. Mutational analyses of the active site of RNase of Bacillus intermedius (binase). FEBS Letters. 1994; 354: 305-306.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-00-00060 и гранта РФФИ №18-74-00108.*

## ОЦЕНКА СОЧЕТАННОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ *POLIANTHES. TUBEROSA* И БИНАЗЫ/ДОКСОРУБИЦИНА НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

*Камалова Я. Н., Карамова Н. С., Зеленихин П. В.*

КФУ, ИФМиБ, кафедра микробиологии, г. Казань

[yazgulen@mail.ru](mailto:yazgulen@mail.ru), 89534088382

**Введение.** В настоящее время монотерапия опухолевых заболеваний зачастую является малоэффективной [1]. Сочетанная (или комбинированная) терапия с использованием двух или более терапевтических агентов воздействует на одну или несколько молекулярных мишеней, повышает чувствительность опухолевых клеток к другим лекарствам и показывает многообещающий потенциал в лечении рака [2].

**Материалы и методы.** Анализ жизнеспособности клеток проводили с помощью МТТ-теста. Клетки линии аденокарциномы двенадцатиперстной кишки HuTu80 высевали в 96-луночные планшеты (10<sup>4</sup> клеток/луночка). После инкубации при 37<sup>0</sup>С в атмосфере 5% СО<sub>2</sub> старую среду для культивирования клеток заменяли средой DMEM, содержащей исследуемые агенты. Диапазон исследованных концентраций для доксорубицина составлял 0,01; 0,05; 0,1; IC<sub>50</sub>-0,656; 1; 5; 10; 50; 100 мкг/мл, для биназы 10, 25, 50, 100, 300, 500, IC<sub>50</sub>-591, 700, 1000, 2000 мкг/мл, для экстракта листьев *P. tuberosa* 10, 20,50, IC<sub>50</sub>-70,735; 100, 300, 500, 700, 1000, 1500 мкг/мл. Сочетанный эффект нескольких препаратов был оценен в четырех комбинациях. Концентрации доксорубицина и экстракта и биназы и экстракта были переменными в комбинации 1 и комбинации 2. Комбинации 3 и 4 были предназначены для изучения сочетанного действия различных концентраций одного компонента, когда значение IC<sub>50</sub> другого вещества оставалось неизменным. В комбинации 3 клетки обрабатывали фиксированной IC<sub>50</sub> доксорубицина и биназы в сочетании с различными концентрациями экстракта. В сочетании 4 была фиксированная концентрация IC<sub>50</sub> экстракта, а концентрации доксорубицина и биназы были переменными. Клетки подвергались воздействию исследуемых факторов в течение 24 часов. Затем в лунки вносили по 10 мкл раствора МТТ (5 мг/мл) и 90 мкл полной среды и инкубировали в течение 2-3 ч при 37<sup>0</sup>С. Далее, предварительно удалив среду из лунок, растворяли образовавшиеся кристаллы формазана в 100 мкл диметилсульфоксида в течение 5 минут при 37<sup>0</sup>С. OD измеряли с помощью сканирующего спектрофотометра при λ=570 нм в качестве длины волны обнаружения. За 100% принимали жизнеспособность клеток в негативном контроле.

Для интерпретации результатов по определению синергизма, аддитивности и антагонизма лекарственных средств мы использовали единую теорию, представленную Chou [3]. Значения индекса сочетания (CI) были определены с использованием следующего уравнения:

Для сочетания доксорубицина и экстракта

$$CI = \frac{[Докс]}{[Докс]_x} + \frac{[Экс]}{[Экс]_x} + \frac{[Докс] * [Экс]}{[Докс]_x * [Экс]_x}$$

Для сочетания биназы и экстракта

$$CI = \frac{[Бин]}{[Бин]_x} + \frac{[Экс]}{[Экс]_x} + \frac{[Бин] * [Экс]}{[Бин]_x * [Экс]_x}$$

[Докс], [Бин] и [Экс] представляют собой концентрации доксорубицина, биназы и экстракта в комбинации друг с другом, ингибирующей x% жизнеспособности клеток. [Докс]<sub>x</sub>, [Бин]<sub>x</sub> и [Экс]<sub>x</sub> представляют собой дозы только доксорубицина, биназы и

экстракта в монообработке, соответственно, ингибирующие  $x\%$  жизнеспособности клеток. Значения CI были использованы для определения синергии ( $CI < 0,9$ ), аддитивности ( $0,9 < CI < 1,1$ ) и антагонизма ( $CI > 1,1$ ) тестируемых комбинаций веществ.

**Результаты.** При применении формул для определения синергии двух веществ были сделаны следующие заключения. При совместном действии биназы и экстракта листьев *P. tuberosa* в 50% сочетаний наблюдалась синергия, которая в большинстве случаев была обнаружена при сочетании IC50 экстракта и всех концентраций биназы, кроме значений 10 и 2000 мкг/мл, а также при 25-100 мкг/мл биназы и 500-1000 мкг/мл экстракта, при IC50 биназы и 70.735-500 мкг/мл экстракта. Аддитивность была характерна для различных сочетаний действующих веществ. Например, при сочетании максимальной концентрации биназы 2000 мкг/мл и минимальной концентрации экстракта 10 мкг/мл, также при минимальной концентрации биназы 10 мкг/мл и максимальной концентрации экстракта 1500 мкг/мл; в сочетании IC50 экстракта и 10 и 2000 мкг/мл биназы. Антагонизм был характерен для сочетаний минимальных и максимальных значений концентрации биназы и экстрактов, а также для IC50 биназы и 10-50 мкг/мл и 1000-1500 мкг/мл экстракта.

У сочетания доксорубицина и экстракта синергия наблюдалась в 17% случаев, в основном при совместном действии доксорубицина в концентрации IC50 и растительного экстракта в диапазоне концентраций 100-700 мкг/мл. Аддитивность была отмечена при сочетании минимальных концентраций доксорубицина 0.01-0.05 мкг/мл и максимальных 1000-1500 мкг/мл экстракта, а также при концентрации 1 мкг/мл доксорубицина и 100 мкг/мл экстракта. В остальных случаях наблюдали антагонизм, то есть подавление активностей двух соединений друг другом.

**Обсуждение.** Нами установлено, что при совместном действии биназы и экстракта листьев *P. tuberosa* в 50% комбинаций наблюдалась синергия. Ранее было показано, что одновременное применение биназы с экстрактами растений альбиции лебекк *Albizia lebbek* и баухинии пестрой *Bauhinia variegata* (*Fabaceae*), а также колбасного дерева *Kigelia africana* (*Bignoniaceae*) способствовало усилению индукции апоптоза клеток аденокарциномы легких человека A549, по сравнению с действием биназы и экстрактов в отдельности [4].

Установлено, что у сочетания доксорубицина и экстракта листьев *P. tuberosa* синергия наблюдалась в 17% сочетаний. В большинстве комбинаций наблюдали антагонизм, то есть подавление противоопухолевой активности двух соединений друг другом. Однако в данных литературы есть примеры успешного применения доксорубицина в сочетанной противоопухолевой терапии, например, с таксаном [5].

**Заключение.** Таким образом, применение сочетания доксорубицина и экстракта листьев *P. tuberosa* для лечения опухолей кишечника менее целесообразно, по сравнению с биназой.

#### Список литературы

1. J. S. Lopez, U. Banerji. Combine and conquer: challenges for targeted therapy combinations in early phase trials. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2017; 14: 57–66.
2. T. A. Yap, A. Omlin, J. S. d. Bono. Development of therapeutic combinations targeting major cancer signaling pathways. *J. Clin. Oncol.* 2013; 14: 1592–1605.
3. T. C. Chou. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews.* 2006; 58: 621–681.



4. Н. С. Карамова, П. В. Зеленихин, Н. Б. Мирошник, И. Абдул-Хафиз, Я. Н. Закирова, О. Н. Ильинская. Апоптозиндуцирующее действие рибонуклеазы *Bacillus pumilus* и экстрактов лекарственных растений Египта на клетки аденокарциномы легких человека. Гены и клетки. 2015; 10: 62-67.

5. J. Czepas, K. Gwozdziński. The flavonoid quercetin: Possible solution for anthracycline-induced cardiotoxicity and multidrug resistance. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2014; 68: 1149–1159.

## ВЛИЯНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ИНГИБИРОВАНИЯ АУТОФАГИИ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК РАКА ЛЕГКОГО К ЦИСПЛАТИНУ

*Мазитова А. М., Топчу Ю. А., Габбасов Р. Т., Абрамова З. И.*

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

[sashamazitova@mail.ru](mailto:sashamazitova@mail.ru) +79274321826

**Введение.** эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) один из основных биологических процессов при канцерогенезе [1]. Аутофагия – катаболический процесс, в ходе которого поврежденные компоненты клетки удаляются, помогая преодолевать внутриклеточный и внеклеточный стресс, включая лишение питательных веществ, гипоксию и эффект лечения лекарствами [2]. ЭМП представляет собой сложную трансдифференцировку, через которую опухолевые клетки приобретают мезенхимальные особенности, включая подвижность и метастатический потенциал [3]. Цель данной работы – исследование роли аутофагии в ответе клеток немелкоклеточного рака легкого на лечение цисплатином и влияние данного процесса на приобретение клетками мезенхимального фенотипа.

**Материалы и методы.** Работа проведена на клеточных линиях немелкоклеточного рака легкого А549. Изменение уровня экспрессии белков-маркеров аутофагии (LC3В, р62), апоптоза (каспаза-3) и ЭМП (Е-кадгерина) детектировали вестерн-блоттингом.

**Результаты.** В ходе исследования было показано, что при лечении цисплатином в течение 24, 48 и 72 часов клетки аденокарциномы легкого А549 отвечают повышением уровня аутофагии (повышение уровня белков LC3В и р62). Этот эффект сопровождается блокированием апоптоза (снижение уровня активированной каспазы-3). Также при индукции аутофагии наблюдалась снижение уровня маркера эпителиального фенотипа клеток – Е-кадгерина. Фармакологическое ингибирование аутофагии с помощью 3-метиладена в концентрации 5 мМ приводило к повышению доли апоптотических клеток и повышению уровня Е-кадгерина.

**Обсуждение.** Показано, что индукция аутофагии под действием цисплатина способствовала миграции клеток (тест «лечение раны»). Фармакологическое ингибирование аутофагии подавляло усиленную миграцию клеток. На основании приведенных данных

можно предположить, что при лечении цисплатином клетки перестраиваются в сторону мезенхимального фенотипа, что, возможно, регулируется аутофагией.

**Заключение.** Подобраны условия для фармакологического ингибирования аутофагии в клетках НМРЛ, а также выявлена способность клеток изменять способность к миграции под действием аутофагического ингибитора.

#### *Список литературы*

1. Gugnoni M., Sancisi V., Manzotti G. et al., Cell Death Dis. 7(12): e2520 (2016).
2. Kalluri R, Weinberg RA. J Clin Invest 119: 1420–1428 (2009).
3. Boya P., Reggiori F., Codogno P. Nat Cell Biol. 15: 713–720 (2013).

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00495.*

### **ЛОКАЛИЗАЦИЯ ДОМЕНОВ НАТРИЙ–ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NaPi2b НА МЕМБРАНЕ КЛЕТОК РАКА ЯИЧНИКА ЧЕЛОВЕКА.**

*Нургалиева А.К., Скрипова В.С., Минигулова Л.Ф., Богданов М.В., Киямова Р.Г.*

Казанский (Приволжский) федеральный университет

[alsina97@mail.ru](mailto:alsina97@mail.ru)

**Введение.** Развитие злокачественных опухолей сопровождается значительными изменениями клеточного микроокружения (окислительный стресс, закисление среды, гипоксия и др.), что может вызывать конформационные изменения мембранных белков с экспонированием опухоль-специфических эпитопов и целых доменов, которые могут быть использованы в качестве мишеней для таргетной терапии.

В 2008 году натрий–зависимый фосфатный транспортер NaPi2b был идентифицирован в качестве молекулярной мишени для моноклональных антител МХ35 [1]. NaPi2b - это мембранный белок, который принимает участие в поддержании фосфатного гомеостаза в организме [2]. Несмотря на тот факт, что NaPi2b экспрессируется в нормальных тканях, терапевтические антитела МХ35 накапливаются, преимущественно, в опухолевых клетках, что позволяет предположить наличие опухоль-специфичного эпитопа, конформацию которого может обеспечить только клетка опухоли [3]. В связи с этим, NaPi2b, несомненно, является привлекательной мишенью для разработки новых подходов к таргетной терапии и диагностики рака яичника.

На данный момент нет разрешенной структуры транспортера NaPi2b и локализация его экстрамембранных доменов до сих пор не была показана. Согласно данным *in silico* моделирования, транспортер NaPi2b имеет от 8 до 11 трансмембранных доменов, а его N- и С-концевые домены локализованы внутри клетки. Поэтому изучение топологии натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b необходимо для более глубокого понимания структуры транспортера и практического применения полученных фундаментальных знаний в терапии онкологических заболеваний.

Целью данной работы является определение локализации экстрамембранных доменов натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b на мембране клеток рака яичника человека.

**Материалы и методы.** Локализацию доменов натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b на мембране клеток определяли с помощью иммуофлуоресцентного окрашивания фиксированных препаратов клеток моноклональными антителами против против большого внеклеточного домена (L-NaPi2b) [2] и против его N-концевого участка (N-NaPi2b) [4].

Для анализа была выбрана клеточная линия рака яичника OVCAR-4, которая по результатам вестерн-блот анализа имеет высокий уровень экспрессии NaPi2b, а также, линия OVCAR-8 в качестве отрицательного контроля, т.к. в клетках данной линии не было обнаружено экспрессии NaPi2b по результатам вестерн-блот анализа.

Для определения локализации доменов белка на мембране клеток подготовку препаратов проводили в условиях с или без этапа пермеабиллизации клеточной мембраны. Для исключения ложноположительного окрашивания препаратов проводили окраску только вторичными мечеными антителами без окраски первичными антителами. Неспецифического связывания вторичных антител не было выявлено.

**Результаты.** Результаты иммуофлуоресцентного анализа клеток OVCAR-8, окрашенных моноклональными антителами L-NaPi2b и N-NaPi2b, показали отсутствие экспрессии транспортера NaPi2b, что подтверждает результаты вестерн-блот анализа.

Результаты иммуофлуоресцентного анализа клеток OVCAR-4, окрашенных моноклональными антителами L-NaPi2b, показали наличие специфического сигнала как в условиях с пермеабиллизацией, так и без нее.

Результаты иммуофлуоресцентного анализа клеток OVCAR-4, окрашенных моноклональными антителами N-NaPi2b, показали наличие специфического сигнала преимущественно в условиях с пермеабиллизацией, а также присутствие специфического сигнала в 5% клеток с ненарушенной целостностью мембраны.

**Обсуждение.** Наличие специфического сигнала от антител L-NaPi2b в условиях без пермеабиллизации говорит о том, что большой внеклеточный домен NaPi2b находится на внешней поверхности мембраны клеток.

Усиление специфического сигнала от антител N-NaPi2b при пермеабиллизации говорит о том, что N-концевой домен NaPi2b находится внутри клетки. Наличие небольшого процента позитивно окрашенных клеток в условиях без пермеабиллизации может быть свидетельством того, что часть молекул транспортера NaPi2b меняет свою топологию и «переворачивается» в мембране с релокализацией N-концевого домена на внешнюю поверхность мембраны.

**Заключение.** Таким образом, с помощью иммуофлуоресцентного анализа было показано, что большой внеклеточный домен транспортера NaPi2b локализован на внешней поверхности мембраны клеток OVCAR-4, а N-концевой домен транспортера NaPi2b, по-видимому, может быть локализован как снаружи, так и внутри клетки, что требует дальнейшего изучения.

#### *Список литературы*

1.B.Yin, R. Kiyamova, R. Chua, O.L. Caballero, I. Gout, V. Gry-shkova, N. Bhaskaran, S. Souchelnytskyi, U. Hellman, V. Filo-nenko, A.A. Jungbluth, K. Odunsi, K.O. Lloyd, L.J. Old, G.

Ritter. Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas. *Cancer Immun.* 2008; 8.

2. H. Murer, I. Forster, J. Biber. The sodium phosphate cotransporter family SLC34. *Pflügers Arch — Eur J Physiol.* 2004; 447: 763-767.

3. M.J. Mattes, K. Look, K. Furukawa, et al. Mouse monoclonal antibodies to human epithelial differentiation antigens expressed on the surface of ovarian carcinoma ascites cells. *Cancer Res.* 1987; 47: 6741–6750.

4. V. Gryshkova, D. Lituiev, L. Savinska, R. Kiyamova. Generation of Monoclonal Antibodies Against Tumor-Associated Antigen MX35/sodium-Dependent Phosphate Transporter NaPi2b. *Hybridoma.* 2011; 30: 37–42.

## СОЧЕТАННОЕ ДЕЙСТВИЕ БИНАЗЫ И 5-ФТОРУРАЦИЛА НА КЛЕТКИ HELa

*Петрова Анна Вениаминовна, Зеленихин Павел Валерьевич*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

[anyahfb2013@gmail.com](mailto:anyahfb2013@gmail.com), +7-965-594-57-35

**Введение.** Одной из важных стратегий разработки эффективных противоопухолевых средств является изучение сочетания природных агентов и противоопухолевых препаратов. Комбинированное лечение рака требует повышенного внимания, поскольку повышает эффективность комбинированных средств и снижает их токсичность за счет снижения дозы, необходимой для терапевтической пользы. Хорошо известны цитотоксические и апоптозиндуцирующие свойства РНКазы *Bacillus pumilus*, которая способна индуцировать гибель клеток опухолей различных типов. Традиционным химиотерапевтическим препаратом в лечении рака шейки матки является 5-фторурацил, который ингибирует процесс деления клеток путем блокирования синтеза ДНК. Целью исследования являлась оценка сочетанного действия биназы и 5-фторурацила в отношении клеток HeLa. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи: определение цитотоксической активности биназы и 5-фторурацила в отношении клеток HeLa в МТТ-тесте; характеристика сочетанного действия биназы и 5-фторурацила на клетки HeLa с выявлением зон синергии, аддитивности и антагонизма агентов.

**Материалы и методы.** В работе использовали биназу – гуанилспецифичную РНКазу *Bacillus pumilus* (молекулярная масса 12.2 кДа, 109 аминокислотных остатков, pI=9.5). Вторым объектом исследования является 5-фторурацил (молекулярная формула C<sub>4</sub>H<sub>3</sub>F-N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>, молекулярная масса 130.078 г/моль) (Ebewe pharma, Австрия). Сочетанное действие биназы и 5-фторурацила исследовали с использованием линии клеток HeLa клеток карциномы шейки человека (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Россия). Клетки HeLa культивировали в среде RPMI 1640 (Пан-Эко, Россия) с добавлением 10% фетальной сыворотки (NuClone, Австралия), 2 мМ глутамин и по 100 ед/мл пенициллина и стрептомицина во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> при 37<sup>0</sup>С. Снятие клеток с матрасов для клеточных культур производили согласно Фрешни [1]. Затем производили посев на 96-луночный планшет (SPL Biosciences, Южная Корея). В каждую лунку планшетов вносили в суспензии 1x10<sup>4</sup> клеток/лунку и доводили объем среды до 100

мкл/лунку. По достижении монослоя клеток 60% конфлюэнтности заменяли среду в лунках на свежую с добавлением биназы и 5-фторурацила. Характеристику изменений жизнеспособности клеток HeLa производили в МТТ-тесте. На основании полученных данных рассчитывали концентрацию полумаксимального ингибирования жизнеспособности клеток при помощи онлайн-калькулятора ААТ Bioquest LD50 Calculator (<https://www.aatbio.com/tools/ld50-calculator/>).

Для характеристики возможных комбинационных эффектов препаратов использовали методический подход, изложенный в работе Tsakalozou [2]. При оценке изменений жизнеспособности клеток HeLa под действием биназы и 5-фторурацила варьировали сочетания действующих агентов: 10 мкг/мл – 750 мкг/мл для биназы и 10 мкг/мл – 2000 мкг/мл для 5-фторурацила. Изменения жизнеспособности оценивали при инкубировании клеток в присутствии агентов и их сочетаний в течение 24 ч. Каждую комбинацию исследовали не менее, чем в двух сериях экспериментов с пятью повторностями для каждого варианта обработки.

Полученные результаты обрабатывали при помощи оригинального математического аппарата, предложенного Chou [3]. Данный подход позволяет рассчитать комбинационные индексы (CI) для различных сочетаний препаратов и детерминировать их синергическое, аддитивное и антагонистическое взаимодействие. Расчет индекса производится по формуле:

$$CI = \frac{[Bi]}{[Bi]_x} + \frac{[5-fu]}{[5-fu]_x} + \frac{[Bi] * [5-fu]}{[Bi]_x * [5-fu]_x}$$

где: [Bi] и [5-fu] - концентрации биназы и доксорубина, соответственно, в комбинации, ингибирующие x% жизнеспособности клеток. [Bi]<sub>x</sub> и [5-fu]<sub>x</sub> - дозы только биназы и доксорубина, соответственно, ингибирующие x% жизнеспособности.

Согласно [3] значения CI<0.9 соответствуют синергетическому взаимодействию препаратов, 0.9 < CI < 1.1 аддитивным и CI>1.1 - антагонистическим.

**Результаты.** Биназа проявила умеренную способность снижать выживаемость клеток HeLa в варианте монообработки. Значение показателя выживаемости составило 96±12 %, 86±14 %, 72±8 %, 61±9 %, 50±6 % и 49±11 % для концентраций РНКазы 10 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 300 мкг/мл, 500 мкг/мл и 750 мкг/мл, соответственно. Достоверное снижение жизнеспособности клеток зафиксировано для концентраций РНКазы 100 мкг/мл и выше.

5-фторурацил обладал незначительной цитотоксичностью по отношению к клеткам HeLa. Значение показателя выживаемости составило 97±16 %, 85±11 %, 71±11 %, 69±5 %, 81±10 % и 71±21 % для концентраций антибиотика 10 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл, 500 мкг/мл, 1000 мкг/мл и 2000 мкг/мл, соответственно.

Была составлена карта сочетанного действия биназы и 5-фторурацила в отношении клеток HeLa. Установлено, что тестируемые препараты в диапазоне исследуемых концентраций проявили в основном лишь антагонистическую активность. Лишь в одной комбинации с сочетанием 10 мкг/мл биназы и 10 мкг/мл 5-фторурацила удалось зафиксировать значительную синергию действия цитотоксикантов (CI= 0.1055). Также в ряде комбинаций отмечается аддитивность препаратов: 10 мкг/мл биназы и 500 мкг/мл 5-фторурацила; 300 мкг/мл биназы и 10 мкг/мл 5-фторурацила; 750 мкг/мл биназы и 10 мкг/мл 5-фторурацила.

**Обсуждение.** Полученные данные свидетельствуют о высокой устойчивости исследуемых клеток к 5-фторурацилу. Охарактеризовано сочетанное действие биназы и 5-фторурацила по отношению к клеткам рака шейки матки HeLa. Особого внимания заслуживает обнаруженная синергетическая активность препаратов в диапазоне малых доз, что дает основания полагать, что потенциальные терапевтические подходы с использованием данной комбинации цитотоксикантов будут обладать малой выраженностью побочных эффектов при сохранении эффективности.

**Заключение.** Таким образом, нами определены параметры сочетанного действия биназы и 5-фторурацила на клетки HeLa. После 24 ч воздействия препаратов при сочетании 10 мкг/мл биназы и 10 мкг/мл 5-фторурацила наблюдалась значительная синергия действия (CI= 0.1055). В большинстве прочих испытанных комбинаций препараты проявили антагонизм.

#### *Список литературы*

1. R. I. Freshney Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques. 3<sup>rd</sup> Edition. Wiley-Liss. 1993. DOI 10.1002 / 9780471747598
2. E. Tsakalozou, A.M. Eckman, Y. Bae. Combination Effects of Docetaxel and Doxorubicin in Hormone-Refractory Prostate Cancer Cells. Biochemistry Research International. 2012; 2012: 832059.
3. T. Chou. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacological Reviews. 2006; 58: 621-681.

### **ПРОДУКТЫ $\omega$ -ОКИСЛЕНИЯ ПАЛЬМИТИНОЙ КИСЛОТЫ КАК ИНДУКТОРЫ АГГРЕГАЦИИ И ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ И ИСКУССТВЕННЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН**

*Степанова А.Е., Самарцев В.Н., Белослудцев К.Н., Хорошавина Е.И., Дубинин М.В.*

ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет»

[lady.stepanova2010@yandex.ru](mailto:lady.stepanova2010@yandex.ru)

**Введение.** Одним из минорных путей метаболизма монокарбоновых жирных кислот у млекопитающих и человека является их  $\omega$ -окисление, происходящее, главным образом, в клетках печени и почек и приводящее к образованию соответствующих  $\alpha,\omega$ -дикарбоновых кислот. При некоторых патологических состояниях, когда активность основных путей метаболизма жирных кислот (прежде всего,  $\beta$ -окисление жирных кислот в митохондриях) недостаточна,  $\omega$ -окисление становится намного более интенсивным. Это сопровождается накоплением конечных продуктов этого процесса  $\alpha,\omega$ -дикарбоновых кислот, а также промежуточных метаболитов  $\omega$ -гидроксикарбоновых кислот в крови и клетках [1]. Показано, что насыщенные кислоты разной структуры в присутствии  $Ca^{2+}$  могут оказывать детергентное, пертурбирующее и протонифицирующее действие при взаимодействии с биологическими и искусственными мембранами. Целью настоящей работы являлось изучение молекулярного механизма действия одного из продуктов  $\omega$ -окисления пальмитиновой кислоты, а именно  $\omega$ -гидроксипальмитиновой кислоты (ГПК) как индуктора

Ca<sup>2+</sup>-зависимой пермеабиллизации внутренней мембраны митохондрий и искусственной мембраны липосом.

**Материалы и методы.** Работа была проведена на митохондриях печени и эритроцитах крыс-самцов весом 210–250 г. Митохондрии из печени выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования с последующим освобождением от эндогенных жирных кислот с помощью бычьего сывороточного альбумина в соответствии с методикой [2]. Липосомы были получены методом экструзии с использованием микроэкструдера «Avanti» (Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL) [3].

**Результаты и обсуждение.** В результате проведенной работы нами установлено, что ω-гидроксипальмитиновая кислота способна индуцировать агрегацию нагруженных Ca<sup>2+</sup> митохондрий печени, которая сопровождается пермеабиллизацией внутренней мембраны органелл (рис. 1). Такая пермеабиллизация сопровождается снижением мембранного потенциала органелл, окислением пула NAD(P)H и выходом проапоптотического белка цитохрома с из органелл.

Чтобы проверить нашу гипотезу о механизме действия ГПК как индуктора Ca<sup>2+</sup> - зависимой агрегации митохондрий, нами изучено влияние ω-гидроксипальмитиновой кислоты на лецитиновые липосомы. В отсутствие Ca<sup>2+</sup> ГПК не влияла на размер липосом (рис. 2). Однако добавление Ca<sup>2+</sup> к липосомам, содержащим эту кислоту, приводило к значительному увеличению диаметра (до 1990 нм). Это указывает на то, что в присутствии ГПК и Ca<sup>2+</sup> происходят динамические процессы, которые приводят к изменению размера липосом, которое может быть вызвано агрегацией везикул.

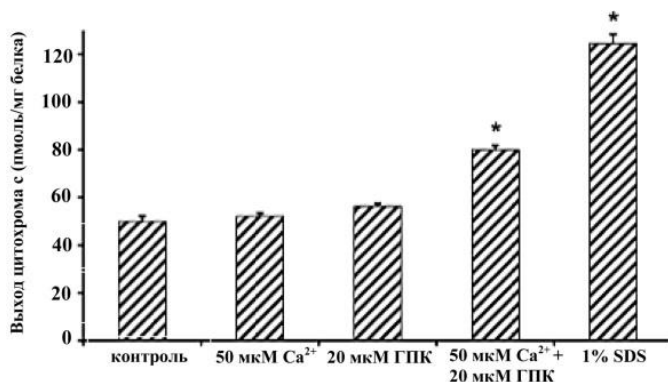


Рис. 1. Выход цитохрома с из митохондрий печени в присутствии различных добавок. Представлены средние значения ± ошибка средней (n=3). \* P < 0,05 по сравнению с контролем (без добавок).

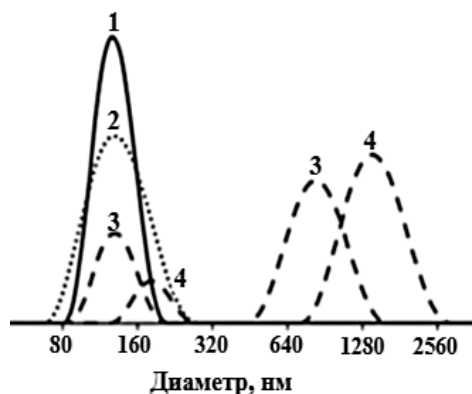


Рис. 2. Изменение размера лецитиновых липосом. 1 - липосомы; 2 - липосомы + 40 мкМ ГПК; 3 - липосомы + 50 мкМ ГПК + 1 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  (сразу после добавления); 4 - липосомы + 50 мкМ ГПК + 1 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  (через 12 минут после добавления).

**Заключение.** Учитывая схожесть эффектов указанных кислот на митохондриях и липосомах нами предположено наличие универсального механизма, лежащего в основе  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации липидных мембран этими кислотами, который заключается в их агрегации и перестройке липидов мембран.

#### *Список литературы*

1. R. J. Wanders, J. Komen, and S. Kemp, FEBS J. 278, 182 (2011)
2. Dubinin M.V. Samartsev V.N., Astashev M.E., Kazakov A.S., Belosludtsev K.N. (2014) A Permeability Transition in Liver Mitochondria and Liposomes Induced by  $\alpha,\omega$ -Dioic Acids and  $\text{Ca}^{2+}$  Eur. Biophys. J., 43(10-11), 565-572.
3. Agafonov A. A permeability transition in liposomes induced by the formation of  $\text{Ca}^{2+}$ /palmitic acid complexes / Agafonov A., Gritsenko E., Belosludtsev K., Kovalev A., Gateau-Roesch O., Saris N.-E.L., Mironova G.D. // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – Vol. 1609. – P. 153-160.

*Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации № МК-61.2019.4.*

## **ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕРСПЕКТИВНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МАКРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

*Субакаева Евгения Владимировна, Зеленихин Павел Валерьевич*

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет

[zs\\_zs97@mail.ru](mailto:zs_zs97@mail.ru), 89053124259

**Введение.** Разработка новых водорастворимых молекулярных систем доставки, способных повысить биодоступность и снизить токсичность противоопухолевых препаратов, является актуальной задачей для супрамолекулярной химии.

За последнее десятилетие было разработано несколько макроциклических структур, которые были успешно внедрены в надмолекулярные системы доставки лекарств [1]. Однако плохая растворимость в воде значительно снижала терапевтическую эффективность [2].

Амфифильные макроциклы, способные к ассоциации и агрегации, считаются основным решением вышеуказанной проблемы. Гибкая природа основного фрагмента макроциклов и дальнейшая модификация делают их идеальными для использования в качестве лекарственных средств и носителей лекарственных средств [3].

Многие производные каликсарена и пилларарена проявляли низкую токсичность на животных моделях или вообще не проявляли ее, что еще больше увеличивало их спрос в области биофармацевтических применений [4], однако впоследствии были синтезированы соединения и с избирательно токсичными свойствами.



Создается необходимость исследования биологических свойств новосинтезированных соединений, поскольку вещества, планируемые для использования в вышеупомянутых целях, должны отвечать требованиям биосовместимости и биобезопасности, поэтому, в связи с вышесказанным, целью настоящей работы стала оценка цитотоксического действия ряда пиллараренов и каликсаренов, по отношению к клеткам аденокарциномы лёгких А-549.

**Материалы и методы.** В работе использовали различные образцы каликсаренов (P1, P2, P3, P4) и пиллараренов (P5, P6), сходные по строению каркаса макроциклов, но отличающиеся заместителями, синтезированные и любезно предоставленные группой проф. д.х.н. Стойкова И.И. (Химический институт имени А. М. Бутлерова, КФУ). При определении цитотоксичности образцов каликсаренов и пиллараренов использовали линию клеток аденокарциномы лёгких А549. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят, а также 2мМ глутамина, пенициллин и стрептомицин (по 100 ед/мл), при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Изменения жизнеспособности клеток А549 под действием макроциклических аренов и наночастиц фиксировали при помощи МТТ-теста *in vitro*.

**Результаты.** Охарактеризована цитотоксичность каликсаренов P1, P2, P3 и P4. Показано, что исследованные каликсарены значительно ингибируют жизнеспособность клеток А549 в концентрациях выше 5 мкг/мл. IC50 каликсаренов составило 4.826 мкг/мл, 4.673 мкг/мл, 4.536 мкг/мл и 3.216 мкг/мл для соединений P1, P2, P3 и P4, соответственно.

Охарактеризована цитотоксичность пиллар[5]аренов P5 и P6. Во всем диапазоне исследованных концентраций (0.5-50 мкг/мл) пилларарены не обладали выраженной цитотоксической активностью в отношении клеток А549.

**Обсуждение.** Полученные нами данные коррелируют с исследованиями похожих по структуре соединений. Так, водорастворимый каликс[4]арен РТХ008, молекулярной мишенью которого является галектин-1 (белок, вовлеченный в различные аспекты опухолевого происхождения), был охарактеризован как сильный ингибитор ангиогенеза в анализах пролиферации и миграции клеток рака яичника и меланомы [Thijssen et al., 2006]. Следовательно, данные каликсарены, по-видимому, являются многообещающими для применения в противоопухолевой терапии.

**Заключение.** Таким образом, проведенное нами исследование подтвердило биосовместимость и биобезопасность пиллараренов, а также показана высокая цитотоксичность аналогичных им каликсаренов. Данные различия биологического действия, по-видимому, связаны с особенностями макроциклического каркаса соединений и не зависят от строения исследованных боковых радикалов.

#### Список литературы

1. T. Ramasamy, H. B. Ruttala, B. Gupta, B. K. Poudel, H. G. Choi, C. S. Yong, J. O. Kim. Smart chemistry-based nanosized drug delivery systems for systemic applications: A comprehensive review. *Control Release*. 2017; 258: 226-253.
2. K. Jie, Y. Zhou, Y. Yao, F. Huang Macrocylic amphiphiles. *Chem. Soc. Rev.* 2015; 44: 3568-3587.
3. A. Yousaf, S. A. Hamid, N. M. Bunnori, A.A. Ishola. Applications of calixarenes in cancer chemotherapy: facts and perspectives. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 2831-2838.
4. T. Ogoshi, T.A. Yamagishi, Y. Nakamoto. Pillar-Shaped Macrocylic Hosts Pillar[n]arenes: New Key Players for Supramolecular Chemistry. *Chem Rev.* 2016; 116: 7937-8002.

5. V.L. Thijssen, R. Postel, R.J. Brandwijk, R.P. Dings, I. Nesselova, S. Satijn, N. Verhofstad, Y. Nakabeppu, L.G. Baum, J. Bakkers, K.H. Mayo, F. Poirier, A.W. Griffioen. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103: 15975-15980.

Автор выражает благодарность проф., д.х.н. Стойкову Ивану Ивановичу за предоставление образцов макроциклических соединений; ст. преп., к.х.н. Шурпику Дмитрию Николаевичу и Падне Павлу Леонидовичу за консультационную поддержку в области химии макроциклических соединений.

## РОЛЬ БЕЛКА NEDD9 В РЕГУЛЯЦИИ РЕПАРАЦИИ ДНК ПРИ ПРОГРЕССИРОВАНИИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО (НМРЛ).

*Тихомирова М.В., Абрамова З.И., Денека А.Я.*

Место работы: ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет

[mary20011994@mail.ru](mailto:mary20011994@mail.ru)

**Введение.** В настоящее время смертность от рака легкого занимает лидирующее место среди всех онкологических заболеваний и зачастую ассоциируется с рефрактерными к лечению дистальными метастазами [1]. Nedd9 является поддерживающим белком в множестве внутриклеточных белковых каскадов, таких как PI3K-AKT-mTOR, Ras-ERK, играющих ключевые роли в росте и прогрессировании множества опухолей [2]. Высокие уровни белка Nedd9 ассоциируются с метастазами и прогрессированием НМРЛ, а также рядом других онкологических заболеваний [2].

Наиболее частыми причинами возникновения НМРЛ являются активирующая мутация Kras (около 30%) и потеря аллеля p53 (около 60% случаев). Обнаружение этих мутаций позволило создать удобный инструмент для изучения роста и метастазирования немелкоклеточного рака легкого - трансгенную *K-Ras/Trp53* (KRas/p53) мышиную модель, которая уже хорошо изучена и описана в литературе [3]. У этих мышей мутантный аллель *p53* (*p53<sup>R172HΔg</sup>*) сочетается с активирующей мутацией *K-Ras<sup>G12D</sup>* аллеля *K-Ras<sup>LA1</sup>*, что приводит к развитию опухолей в легком, обладающих свойствами, схожими с аденокарциномой человека. Метастазы мышинных KRas/p53 опухолей обнаруживаются в тех же органах, что и у пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Описанные выше свойства, трансгенной *K-Ras/p53* мышинной модели позволяют использовать ее в качестве удобного инструмента для изучения биологических процессов, лежащих в основе развития и метастазирования аденокарциномы. Целью данного исследования является изучение биологической роли поддерживающего белка NEDD9 в регуляции роста и метастазирования аденокарциномы легкого.

**Материалы и методы.** На первом этапе работы над данным проектом проводилась работа с мышинной моделью, трансгенной по KRas/p53. На основе этой модели нами была получена новая порода мышей, трансгенных по Kras/p53, у которых ген Nedd9 полностью «выключен» во всем организме животного. С помощью метода протеиновых тест-систем обратной фазы было исследовано изменение уровней активности более 200 внутриклеточных сигнальных белков в зависимости от статуса активности белка NEDD9. Валидация полученных результатов проводилась *in vitro* с использованием мышинных и человеческих

клеточных линий аденокарциномы легкого и широкого спектра молекулярно-биологических методов, таких как иммуногистохимия, Вестерн блоттинг, клоногенный анализ, анализ средневыводящих кривых жизнеспособности клеток, проточная цитометрия.

**Результаты.** После индицирования роста опухолей в легких мышей нами обнаружено, что у животных с «выключенным» *Nedd9* опухоли достигали большего размера, а также росли быстрее по сравнению с контролем, что было подтверждено с помощью КТ сканирования и патоморфологического анализа ткани легких мышей. У отдельных животных, помимо первичной опухолевой нагрузки, отмечалось метастазирование в плевральную полость и прямая инвазия в сердечную ткань. На дальнейшем этапе были получены лизаты опухолей мышей и проведен анализ опухолевых лизатов с применением протеиновых тест-систем обратной фазы (RPPA) на предмет изменения уровней более 200 белков-маркеров. В ходе механистического анализа обнаружено, что в результате полного «выключения» *Nedd9* уменьшились уровни белков, вовлеченных в системы репарации ДНК (CHK1/2, XPF), а также повысились уровни белков-маркеров аутофагии (BECN1, ATG3/5). В ходе валидации полученных данных *in vitro* подтверждено, что в результате «выключения» NEDD9 с использованием миРНК повышается клоногенная способность клеток, а также повышается чувствительность к терапии цисплатином в 2 из 5 клеточных моделях. В данный момент проводится механистический анализ с целью определения биологического механизма, лежащего в основе обнаруженного фенотипа.

**Обсуждение.** В ходе работы над проектом нами обнаружено, что отсутствие активности поддерживающего белка *Nedd9* в мышинной модели аденокарциномы легкого приводит к развитию более злокачественного фенотипа. На основании собственных результатов и данных литературы нами было сделано предположение, что отсутствие активности белка *Nedd9* на ранних этапах развития опухоли, включая момент опухолевой трансформации клетки, приводит к компенсаторному перестроению внутриклеточных белковых сигнальных путей и в конечном итоге к более злокачественному прогрессированию заболевания, в частности за счет изменений в работе систем репарации ДНК. Роль белка NEDD9 в регуляции этих биологических механизмов не описана в литературе и требует дальнейшего изучения. В настоящее время проводятся эксперименты с целью подтверждения данной гипотезы.

**Заключение.** Суммируя всё выше сказанное, можно сделать вывод о том, что белок NEDD9 способен влиять на рост и развитие аденокарциномы легкого за счет регулирования систем репарации ДНК. Эти белок-белковые взаимодействия играют потенциально важную роль в контексте НМРЛ, так как в случае подтверждения нашей гипотезы представляется возможным номинировать NEDD9 на роль нового маркера-предиктора течения опухолевого процесса и ответа на химиотерапевтическое лечение.

#### *Список литературы*

1. N.A. Howlader, M. Krapcho, D. Miller, K. Bishop, S.F. Altekruse, C.L. Kosary, Y.M. Ruhl, Z. Tatalovich, A. Mariotto, D.R. Lewis, H.S. Chen, E.J. Feuer, K.A. Cronin. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013. National Cancer Institute. Bethesda, MD. 2013. Электронный ресурс режим доступа URL: [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2013/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/) (От ноября 2015, данные исследования SEER, опубликованы в апреле 2016. April).

2. N. Tikhmyanova, J.L. Little, E.A. Golemis. CAS proteins in normal and pathological cell growth control. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2010;67(7):1025-48.
3. E.L. Jackson, K.P. Olive, D.A. Tuveson, R. Bronson, D. Crowley, M. Brown et al. The differential effects of mutant p53 alleles on advanced murine lung cancer. Cancer research. 2005;65(22):10280-8.

*Часть работы выполнена при финансовой поддержке РФФ в рамках научного проекта № 18-75-00104*

## **РОЛЬ БЕЛКА МУСАШИ 2 В РЕГУЛИРОВАНИИ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ VEGFR2-VEGFA ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЁГКОГО**

*Топчу Ю.А.<sup>1\*</sup>, Мазитова А.М.<sup>1</sup>, Югай В.Н.<sup>1</sup>, Ратнер Е.Ю.<sup>2</sup>, Серебрянский И.Г.<sup>1</sup>, Денека А.Я.<sup>1</sup>, Абрамова З.И.<sup>1</sup>, Бумбер Я.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет

<sup>2</sup> ГАУЗ Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ:

[topchu\\_1993@mail.ru](mailto:topchu_1993@mail.ru), +7(927)4164552

**Введение.** Заболеваемость немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) занимает первое место среди мужчин, и второе у женщин, а смертность от этого заболевания занимает лидирующее место в мире. Целью данного исследования являлось выявление механизмов, которые регулируют метастазирование НМРЛ и приводят к возникновению более агрессивного фенотипа этого заболевания и лекарственной устойчивости.

Ранее нами были опубликованы результаты исследования, в котором было обнаружено, что одной из наиболее постоянных фенотипических особенностей метастазирующих клеток рака легкого являлось повышение уровня белка Musashi-2 (MSI2), который играет важную роль при инвазии и метастазировании НМРЛ *in vitro* и *in vivo*. Проведенный нами анализ предполагаемого сигнального пути и скрининг релевантных мишеней MSI2 выявил ряд белков, ассоциированных с эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП) – рецептор фактора роста опухоли TGF- $\beta$  (TGFBR1) I типа, SMAD3, клаудины, а также рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2).

**Материалы и методы.** В ходе данной работы оценка экспрессии белков MSI2 и VEGFR2 в тканевых опухолевых образцах производилась с использованием стандартных гистологических техник, за которым следовали количественный и корреляционные анализы. Регуляция сигнального пути VEGF/VEGFR2 *in vitro* оценивалась методом вестерн блот. Чувствительность клеток к ингибиторам VEGFR2 при снижении экспрессии MSI2 оценивалась с помощью метода определения жизнеспособности клеток с последующим определением полуингибирующей концентрацией (IC<sub>50</sub>).

**Результаты.** Обнаружено, что MSI2 способен регулировать ангиогенез при НМРЛ *in vitro*, а в опухолевых образцах пациентов с НМРЛ его уровни статистически значимо положительно коррелируют с уровнями рецептора VEGFR2, играющего ключевую роль в процессах ангиогенеза. Уменьшение экспрессии MSI2 не отражалось на чувствительности клеток аденокарциномы к ингибиторам VEGFR2.

**Обсуждение.** Нами была исследована роль MSI2 как регулятора онкогенных белковых взаимодействий сигнального пути VEGFR2-VEGF, оценена роль MSI2 в регуляции ответа на воздействие ингибиторами VEGF/VEGFR2. Однако уменьшение экспрессии MSI2 не отражалось на чувствительности клеток аденокарциномы к ингибиторам VEGFR2, и таким образом сделан вывод о том, что с целью совершенствования существующих методов лечения НМРЛ необходим поиск дополнительных комбинаций таргетной терапии, направленных на уменьшение активности других белков-партнеров MSI2.

#### *Список литературы*

1. A.E. Kudinov, A.Y. Deneka, E.A. Golemis, Y. Bumber et al. Musashi-2 (MSI2) supports TGF-beta signaling and inhibits claudins to promote non-small cell lung cancer (NSCLC) metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016; 113(25): 6955-60.
2. Kudinov A. Musashi-2 (MSI2) drives TGFBR1/SMAD3 dependent partial EMT and supports VEGFR2 expression and metastasis of human and mouse NSCLC cells / A. Kudinov, A. Deneka, A. Nikonova, I. Serebriiskii, T.N. Beck, Q. Cai, B.L. Egleston, E. Nicolas, H. Borghaei, D. Gibbons, J. Kurie, E.A. Golemis, Y. Bumber // American Association of Cancer Research Annual Meeting. Book of Abstracts. New Orleans. – 2016. - V. 30. - P. 1584.
3. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies / M. Shibuya // Genes Cancer. – 2011. – Vol.2(12). - P.1097-1105.

*Часть работы выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00307*

### **MUSASHI-2 РЕГУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА И ОТВЕТ НА ТАРГЕТНУЮ ТЕРАПИЮ ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЁГКОГО**

*Югай В.Н.<sup>1</sup>, Топчу Ю.А.<sup>1</sup>, Мазитова А.М.<sup>1</sup>, Ратнер Е.Ю.<sup>2</sup>, Серебрянский И.Г.<sup>1</sup>, Абрамова З.И.<sup>1</sup>, Бумбер Я.А.<sup>1</sup>, Денека А.Я.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет

<sup>2</sup> ГАУЗ Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ

[veronika-yugai@mail.ru](mailto:veronika-yugai@mail.ru)

**Введение.** В настоящее время в большинстве развитых стран мира рак легкого занимает лидирующее место по распространенности у мужчин и второе у женщин [1]. Пятилетняя выживаемость при заболевании немелкоклеточным раком легкого составляет около 16%. Ведущей причиной такой высокой смертности являются распространенные метастазы, наличие которых приводит к изменению биологических свойств опухолевых клеток, сопровождающемуся все возрастающей резистентностью к применяемым методам лечения. Ранее нами было показано, что прогрессированию и метастазированию НМРЛ предшествует повышение экспрессии РНК-связывающего белка Мусаши 2 (Musashi 2, MSI2) [2]. Данная работа посвящена исследованию механизмов регуляции роста и метастазирования НМРЛ белком MSI2 с целью обнаружения новых терапевтических подходов в лечении данного заболевания.

**Материалы и методы.** В данном исследовании был задействован широкий спектр методов биохимии и молекулярной-биологии. Работа проводилась с использованием мышинных клеточных линий немелкоклеточного рака легкого от мышинной модели, трансгенной по  $Kras^{LA1/+}/Trp53^{R172H\Delta G/+}$ , а также человеческих клеточных линий и образцов первичной опухолевой ткани пациентов. С помощью метода протеиновых тест-систем обратной фазы было исследовано изменение уровней активности более 200 внутриклеточных сигнальных белков в зависимости от статуса активности транскрипционного регулятора MSI2. С помощью РНК-преципитации в клеточных линиях была произведена валидация отдельных мишеней. Оценка эффективности таргетной терапии проводилась с помощью анализа средневыводящих кривых жизнеспособности клеток (IC50). Исследование уровней белков в образцах опухолевой ткани пациентов производилось с помощью иммуногистохимических методов, с последующим количественным анализом и статистической обработкой полученных результатов с целью определения корреляционных взаимосвязей.

**Результаты.** С помощью метода протеиновых тест-систем обратной фазы в мышинных клеточных линиях немелкоклеточного рака были идентифицированы основные белки-мишени MSI2. Обнаружено, что выключение MSI2 влечет за собой снижение экспрессии рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), причем регуляция наблюдается на посттранскрипционном уровне. С помощью РНК-преципитации в человеческих линиях аденокарциномы легкого обнаружено, что MSI2 напрямую связывается с мРНК EGFR. Выключение MSI2 нарушало пролиферативную способность клеточных линий с активирующей мутацией EGFR, а также сенситизировало эти клеточные линии к таргетной терапии ингибиторами EGFR - эрлотинибом и афатинибом. Полученные данные были подтверждены в образцах опухолевой ткани пациентов с немелкоклеточным раком легкого: нами обнаружена статистически значимая положительная корреляция экспрессии EGFR и MSI2 в образцах пациентов с немелкоклеточным раком легкого с мутацией EGFR. В образцах пациентов с НМРЛ из неселектированной выборки данной корреляции не наблюдалось.

**Обсуждение.** Рак легкого чаще всего диагностируется на стадии метастазирования, при которой терапия данной нозологии в подавляющем большинстве случаев сопровождается ранними рецидивами за счет быстро развивающейся резистентности. Даже у пациентов с сенситизирующими к таргетной терапии мутациями (такими, как EGFR, ALK, ROS) после первоначального ответа на лечение резистентность развивается в более чем 60% случаев в течение первого года терапии [3]. Поэтому важное значение имеет поиск новых белков-регуляторов опухолевого процесса и потенциальных мишеней таргетной терапии. В данной работе нами исследовано влияние активности транскрипционного регулятора MSI2 на таргетную терапию НМРЛ. Показано, что при снижении активности MSI2 *in vitro* нарушается рост EGFR мутантных клеточных линий, повышается их чувствительность к таргетной терапии ингибиторами EGFR – эрлотинибом и афатинибом. Также нами обнаружена положительная корреляция между уровнями MSI2 и EGFR в образцах ткани пациентов с НМРЛ. В виду того, что низкомолекулярные ингибиторы MSI2 сейчас находятся в активной разработке на стадии доклинических исследований, потенциальная сочетанная таргетная терапия MSI2 и EGFR представляет несомненный интерес для дальнейших исследований.

**Заключение.** Таким образом, нами обнаружено, что белок MSI2 является новым регулятором экспрессии EGFR при НМРЛ. Таргетная терапия MSI2 является потенциально

новым, многообещающим направлением терапии этого заболевания, поэтому определение модуляторов ответа на таргетное лечение, а также новых потенциальных белков-мишеней несет не только важное научное, но и практическое значение.

#### *Список литературы*

1. N.A. Howlader, M. Krapcho, D. Miller, K. Bishop, S.F. Altekruse, C.L. Kosary, Y.M. Ruhl, Z. Tatalovich, A. Mariotto, D.R. Lewis, H.S. Chen, E.J. Feuer, K.A. Cronin. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013. National Cancer Institute. Bethesda, MD. 2013. Электронный ресурс режим доступа URL: [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2013/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/) (От ноября 2015, данные исследования SEER, опубликованы в апреле 2016. April).

2. A.E. Kudinov, A.Y. Deneka, E.A. Golemis, Y. Boumber et al. Musashi-2 (MSI2) supports TGF-beta signaling and inhibits claudins to promote non-small cell lung cancer (NSCLC) metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016; 113(25): 6955-60.

3. I. Astsaturov, E.A. Golemis et al. Synthetic lethal screen of an EGFR-centered network to improve targeted therapies. Sci Signal. 2010; 3(140): 67.

*Часть работы выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00307*

## Секция «Молекулярные механизмы наследственных заболеваний»

### АНАЛИЗ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ЭФФЕКТА РИСК АЛЛЕЛИ А В ОДНОНУКЛЕОДИТНОМ ПОЛИМОРФИЗМЕ ГЕНА *MEF2D* НА АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ТКАНЕ-СПЕЦИФИЧЕСКИЙ СПЛАЙСИНГ.

*Абрамов С.Н., Козырев С.В.*

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет

[007abramov@mail.ru](mailto:007abramov@mail.ru) , +79274004081

**Введение.** Системная красная волчанка (СКВ) хроническое воспалительное аутоиммунное заболевание с гетерогенными клиническими проявлениями и сложной этиологией. При СКВ в организме вырабатываются антитела к собственным антигенам, таким как ДНК и нуклеопротеиновые комплексы. Методом полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) описано около 90 локусов предрасположенности к СКВ [1]. Но это объясняет только малую часть наследственности, поэтому необходимо использовать методы определения нуклеотидной последовательности геномной ДНК (секвенирование) «следующего поколения» для идентификации редких новых генетических вариантов, которые не обнаруживаются GWAS.

Целью работы явился поиск редких функционально значимых генетических вариантов и новых генов предрасположенности к СКВ у человека, используя новейшие методы анализа ДНК, а также изучение молекулярных механизмов влияния этих вариантов и функционирование генов при системной красной волчанке.

**Материалы и методы.** Был сформирован список из 215 генов, основанный на их роли в иммунном ответе и аутоиммунитете у человека и собак, в том числе гены непосредственно ассоциированные с СКВ у человека [2]. Все гены из этого списка были проанализированы направленным секвенированием функционально значимых участков (экзоны, 5'-, 3'-нетранслируемые области, генные промоторы и эволюционно консервативные потенциально регуляторные элементы). Для поиска новых редких полиморфизмов, связанных с заболеванием, была отобрана группа из 156 пациентов с СКВ.

Результаты секвенирования были картированы на геном человека. Для отсеивания статистически недостоверных вариантов, найденные полиморфизмы прошли серию биоинформатических анализов. В результате анализов был отобран полиморфизм rs200395694 в гене *MEF2D* ( $p=0,014$ ).

Влияние различных аллелей полиморфизма rs200395694 было изучено методами анализа изменения (сдвига) электрофоретической подвижности (EMSA) и сравнительного анализа экспрессии репортерного гена, кодирующего фермент люциферазу. Влияние альтернативного аллеля А на активацию сплайсинга гена *MEF2D* изучалось при помощи



создания конструкций, содержащих функциональные участки гена *MEF2D* (минигенные конструкции) с разными аллельными вариантами. Влияние аллелей на экспрессию альтернативных изоформ гена *MEF2D* измеряли методом количественной ПЦР в реальном времени.

**Результаты.** В результате анализа первоначального секвенирования образцов было обнаружено 14206 полиморфизмов, которые отсутствовали у здоровых. При помощи биоинформатического анализа для идентификации полиморфизмов, имеющих потенциальную регуляторную функцию, мы обнаружили статистически значимую ассоциацию с СКВ только для полиморфизма rs200395694 в гене *MEF2D* ( $p=0,014$ ).

Ассоциированный полиморфизм rs200395694 расположен в малом 4 интроне гена *MEF2D* (миоцит-специфического энхансерного фактора 2D/Myocyte-Specific Enhancer Factor 2D). Однонуклеотидный полиморфизм перекрывается сильными регуляторными метками, такими как область гиперчувствительности к ДНКазе I, зонами открытого хроматина, связанными с активацией экспрессии гена. А так же при анализе гистоновых модификаций мы обнаружили, что это единственные зоны, за исключением промотеров и первого интрона, в которых есть гистоновые метки, свидетельствующие о активном энхансере в клетках крови.

Влияние полиморфизма rs200395694 на ДНК связывающую активность белка была исследована методом сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) белков ядерных экстрактов Т-клеток линии Jurkat для подтверждения активности потенциального энхансера, специфичной для Т-клеток. В результате эксперимента, мы наблюдали различную степень связывания с белком основного и альтернативного аллеля в ядерном экстракте.

Регуляторный эффект полиморфизма исследовался с помощью сравнительного анализа экспрессии репортерного гена, кодирующего фермент люциферазу. Альтернативный (риск) аллель А показал различный эффект на экспрессию гена-репортера исследуемых клеточных линий в зависимости от условий эксперимента. Например, альтернативный аллель А в 1,3 раза ( $p=0,02$ ) индуцировал экспрессию в нестимулированных клетках линии Jurkat. При стимуляции клеточной линии Jurkat, основной аллель С показал гораздо более высокую активность люциферазы (в 1,5 раза,  $p=0,0001$ ), что свидетельствует об активной регуляции при участии другого транскрипционного фактора или факторов, с повышенным связыванием с аллелем С.

Так как, для экзона, расположенного на 22 п.о. ниже полиморфизма rs200395694, характерен ткане-специфичный альтернативный сплайсинг, [3] поэтому мы изучили потенциальный эффект альтернативного аллеля А на активацию сплайсинга гена *MEF2D*. Были созданы конструкции, содержащие функциональные участки гена *MEF2D* (минигенные конструкции) с разными аллельными вариантами полиморфизма (Рис 1.).

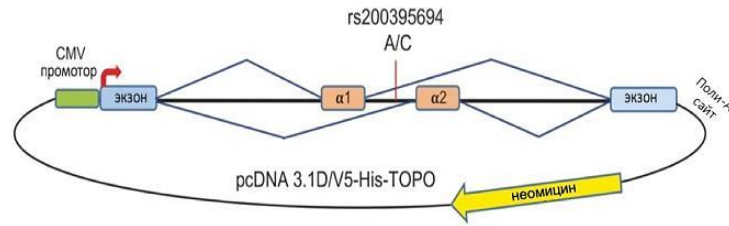


Рисунок 1 - Схема минигенной конструкции. Минигены с альтернативными аллелями клонированы в вектор pcDNA3.1 между промотором CMV и сайтом полиаденилирования. Транскрипция гена неомицина использовалась для нормализации трансфекции.

Минигенные конструкции с двумя различными генотипами были трансфицированы в две клеточные линии, которые не экспрессируют изоформу α2, (Jurkat и HEK293), и две клеточные линии с доказанной экспрессией α2-изоформы (THP-1 и C2C12). Две последние клеточные линии были выбраны как контрольные, так как сплайсинг гена MEF2D ранее изучался на клеточной линии C2C12, а в THP-1 ранее была детектирована экспрессия изоформы α2 [3].

Нам не удалось обнаружить аллельной разницы для изоформы α1, транскрибируемой с минигенных конструкций в клеточных линиях THP-1, HEK293 и Jurkat, и только незначительное увеличение было отмечено для аллель A-содержащих конструктов, трансфицированных в клеточную линию C2C12. Альтернативная изоформа α2, транскрибируемая с минигенной конструкции, содержащей редкий аллель A, была значительно репрессирована во всех протестированных клеточных линиях.

**Обсуждение.** Для поиска редких полиморфизмов, которые обычно пропускаются в общегеномных исследованиях ассоциаций (GWAS), мы применили стратегию целевого направленного секвенирования «следующего поколения» регуляторных высоко консервативных областей кандидатных генов больных СКВ.

Мы предоставили доказательства генетической ассоциации редкого полиморфизма rs200395694: G>T с СКВ у шведских пациентов. Альтернативный риск-аллель так же статистически значимо ассоциирован с триадой клинических проявлений СКВ, включающих anti-Sm, anti-RNP антитела и феномен Рейно. Однонуклеотидный полиморфизм rs200395694:G > T расположен в клеточно-специфическом энхансере, и, по-видимому, оказывает влияние на экспрессию и сплайсинг мРНК гена MEF2D. Хотя ген MEF2D, кодирующий транскрипционный фактор, экспрессируется во многих типах тканей, точная настройка его транскрипции и сплайсинга в соответствующих клетках, может иметь эффект на гены, которые он регулирует, и может способствовать патогенезу заболевания.

**Заключение.** Мы считаем, что стратегия целевого направленного секвенирования регуляторных областей кандидатных генов, использующая технологию секвенирования «следующего поколения», показала свою эффективность в идентификации редкого полиморфизма rs200395694 в гене MEF2D. Несмотря на сравнительно слабую генетическую ассоциацию с СКВ в нашей когорте пациентов, его роль в экспрессии и сплайсинге гена может иметь заметный функциональный эффект. Таким образом, ген MEF2D можно

рассматривать как периферический ген для СКВ, в соответствии с омнигенной моделью комплексных заболеваний.

#### Список литературы

1. G.N. Goulielmos, M.I. Zervou, V.M. et al. The genetics and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) in populations of different ancestry. *Gene*. 2018; 668: 59-72.
2. M. Wilbe, P. Jokinen, K. Truvé et al. Genome-wide association mapping identifies multiple loci for a canine SLE-related disease complex. *Nature genetics* 2010; 42(3):250-254.
3. S. Sebastian, H. Faralli, Z. Yao, et al. Tissue-specific splicing of a ubiquitously expressed transcription factor is essential for muscle differentiation. *Genes & development*. 2013; 27(11): 1247-1259.

### ВЫЯВЛЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

*Р.В. Ларионова<sup>1,2</sup>, Д.Р. Валиева<sup>1</sup>, Е.А. Таха<sup>2</sup>, О.А. Кравцова<sup>1</sup>, М.И. Арлеевская<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> - ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>2</sup> - ГБОУ ДПО Казанская государственная медицинская академия Минздрава России, Казань, Россия

[reginalarionova1993@mail.ru](mailto:reginalarionova1993@mail.ru), тел. +7 900 326 51 78

**Введение.** Ревматоидный артрит (РА) является наиболее частым воспалительным заболеванием суставов. Существует ряд причин, по которым РА имеет высокую медицинскую и социальную значимость.

РА относится к аутоиммунным заболеваниям, имеющим мультифакторную природу в патогенезе которого играют роль как наследственные факторы, так и факторы окружающей среды. Как показали исследования, в течение двух лет, после того как установили диагноз РА, ограничение трудоспособности не является редкостью, а уже через 10 лет становятся нетрудоспособными уже 30% пациентов. В отсутствие эффективной терапии продолжительность жизни больных РА ниже, чем в общей популяции (на 3 года у женщин и на 7 лет у мужчин) [1].

В патогенезе РА, помимо ключевых воспалительных процессов, где в первую очередь, выделяют гены, участвующие в иммунном ответе организма, например, гены главного комплекса гистосовместимости, гены цитокинов и их рецепторов [2], также определенную роль играет и окислительный стресс, который в совокупности с воспалением, может являться триггерным фактором возникновения и развития ревматоидного артрита.

До недавнего времени процессам нарушения работы антиоксидантной системы (АОС) уделялось незначительное внимание, однако в последнее время проявляется все большей интерес к данному вопросу. Один из основных механизмов защиты от окислительного

стресса включает активацию цитопротективных антиоксидантов и ферментов, метаболизирующих ксенобиотики, которые помогают клеткам избавляться от АФК и поддерживать окислительно-восстановительный баланс клетки. Основная роль в запуске транскрипции этих генов принадлежит транскрипционному фактору NRF2, который реагирует на изменения окислительно-восстановительного статуса клетки. Активация этого сигнального пути способствует детоксикации и защитным процессам организма [3].

**Целью** данного исследования явилась оценка изменения уровня относительной экспрессии некоторых генов антиоксидантной системы организма при ревматоидном артрите.

**Материалы и методы.** Было обследовано 288 пациентов в возрасте от 20 до 70 лет, где группа контроля состояла из 131 пациента, а группа с поставленным диагнозом ревматоидный артрит из 157 пациентов. Материалом для генотипирования служили образцы геномной ДНК, выделенной с помощью набора реагентов ДНК-ЭКСПРЕСС КРОВЬ от компании Литех. Анализ генетических полиморфизмов гена NRF2 осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим разделением продуктов амплификации электрофорезом. Все использованные в работе праймеры синтезированы в ЗАО «Евроген» (г. Москва). Разделение продуктов амплификации и рестрикции проводили в нативном 6% полиакриламидном геле с использованием камеры для вертикального электрофореза («Хеликон», г. Москва). Выделение РНК проводили с помощью раствора ExtractRNA. Чистоту и концентрацию выделенных образцов РНК проводили методом спектрофотометрии на спектрофотометре для микрообъемов NanoPhotometer P360 (IMPLEN, Германия). Для получения кДНК из образцов с РНК проводили обратную транскрипцию с помощью набора для синтеза первичной цепи кДНК (MMLV RT kit, Евроген). Расчет относительного уровня экспрессии целевых генов проводили на основе результатов количественного ПЦР-анализа в реальном времени. Количественное содержание кДНК, соответствующей транскриптам целевых и референсных генов, оценивали по разности значений порогового цикла реакции (Ct) для каждого образца.

**Результаты и обсуждения.** В группе пациентов с ревматоидным артритом увеличивается экспрессия гена транскрипционного фактора NRF2 и генов, кодирующих такие ферменты как каталазу (CAT, RQ=1,79, p=0,04), Mn-зависимую супероксиддисмутазу (SOD2, RQ=2,04, p=0,03) и гемоксигеназу-1 (HMOX1, RQ=1,98, p=0,04), при этом активность генов репрессорного белка KEAP1 и NQO1, кодирующего фермент NADPH-хинон-оксидоредуктазу, снижается. Полиморфные локусы -653A/G (rs35652124) и -617A/C (rs6721961) гена NRF2 не ассоциированы с риском развития ревматоидного артрита у населения Республики Татарстан.

Полученные нами данные указывают на то, что при ревматоидном артрите наблюдается, в первую очередь, активация генов, кодирующих основные ферменты АОС и снижение активности генов репрессорного белка KEAP1 и NQO1, что может быть связано с активацией систем выработки активных форм кислорода в ответ на активацию воспалительных процессов, протекающих особенно остро при ревматоидном артрите.

**Заключение.** Исследование влияния генетического полиморфизма на активность генов, биохимическая характеристика оксидативного стресса у больных РА является перспективным направлением не только в понимании молекулярных механизмов развития данной патологии, но и в поиске новых таргетных молекул для разработки лекарственных препаратов при терапии больных РА.

### *Список литературы*

1. M. Abbasi, Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new [Text] /M. Abbasi, R.Alimohammadi, M. H.Bezvan, H. Mohammadi, S. Aslani, M. J. Mousavi, S. Jamalzehi// J Cell Physiol. – 2018. – V.234. – P. 7.
2. M.E. Wenblatt, Division of Rheumatology and Immunology [Text]/ E. Michael Wenblatt, Ellen M. Gravallese. // Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, United States.- 2010.
3. M. L. Ferrándiz, Nrf2 as a therapeutic target for rheumatic diseases [Text] / M. L. Ferrándiz, J. Nacher-Juan, M. J. Alcaraz // BiochemPharmacol. – 2018. – V.152. P. 338-346.

*Данная работа выполнена при финансовой поддержке «Российского Научного Фонда» (№ 17-15-01099).*

## Секция «Математическая биология и биоинформатика»

### ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ СИСТЕМЫ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА У ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ КОМАРОВ-ЗВОНЦОВ СЕМЕЙСТВА CHIRONOMIDAE

*Козлова Ольга Сергеевна, Гусев Олег Александрович*

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет

[olga-sphinx@yandex.ru](mailto:olga-sphinx@yandex.ru) , 89276755130

**Введение.** Большинство стрессовых воздействий – такие, как повышенная температура, обезвоживание или химический шок, – приводит к денатурации и агрегации неправильно свёрнутых белков, что ведёт к потере ими естественных функций и, в конечном итоге, может быть губительно для живой клетки и организма в целом. Вне зависимости от причин нарушения структуры белков и полипептидов, практически все живые существа для предотвращения агрегации и неправильного фолдинга задействуют широкий спектр молекулярных шаперонов, наиболее крупным и эволюционно консервативным из которых считается класс белков теплового шока [1]. Регуляция экспрессии генов, кодирующих белки теплового шока (БТШ, HSP, от «heat-shock proteins»), у эукариот осуществляется благодаря наличию особого семейства транскрипционных факторов – факторов теплового шока (HSF, от «heat-shock factor»), связывающихся со специальной регуляторной последовательностью HSE (от «heat-shock element») в промоторной области гена-мишени [2]. В этой работе мы сравниваем особенности количественного состава, расположения в геноме и особенностей экспрессии генов, кодирующих HSP, у видов, достаточно удалённых друг от друга эволюционно и географически, но объединённых обитанием в экологических нишах, сопряжённых с различными экстремальными воздействиями. В качестве модели используются представители семейства Chironomidae, многие из видов которого во время своей личиночной стадии развития сталкиваются с необходимостью сохранения жизнеспособности в разнообразных экстремальных и нестабильных условиях, для чего задействуют специфические поведенческие, физиологические и молекулярно-генетические адаптации [3].

**Материалы и методы.** Для выделения ДНК использовалась культура клеток Pv11, полученная ранее из эмбриональных клеток африканского ангидробионта *Polypedilum vandeplanki* [4], а также личинки хирономид *Paraborniola tonnoiri* (устойчивый к обезвоживанию вид из Австралии), «Orthoclaadiinae acuticauda» (псаммореобионтный вид, собранный в Псковской области, Россия) и *Polypedilum cf. tamanigrum* (кислото-толерантный вид из Японии). Секвенирование библиотек ДНК проводили в режиме парноконцевого чтения на платформах Miseq и Hiseq (Illumina, США). Также в работе были использованы результаты секвенирования клеточной линии Pv11 на платформе Pacific Biosciences. Для оценки ответа на стресс выделялась и секвенировалась РНК из личинок *P. tonnoiri* (контроль, 8-ми часовое обезвоживание, 24-х часовое обезвоживание, тепловой шок, 3-х часовое восстановление после теплового шока), «Orthoclaadiinae acuticauda» (природный контроль, лабораторный контроль, 3-х часовое восстановление после теплового шока, 24-х

часовое восстановление после теплового шока), *P. cf. tamanigrum* (контроль, 3-х часовое восстановление после теплового шока, ионный стресс – содержание в пресной воде). Исследование молекулярного ответа на стресс у личинок *P. vanderplanki* проводилось на основе ранее секвенированных чтений, отражающих цикл обезвоживания-размачивания личинки [5].

**Результаты.** В собранных *de-novo* геномах представителей семейства Chironomidae было выявлено следующее количество генов, кодирующих малые белки теплового шока HSP20: 13 генов – в геномах «*O. acuticauda*» и *P. tonnoiri*, 15 генов – в геноме *P. vanderplanki* и наименьшее количество генов, 10 – в геноме *P. cf. tamanigrum*. Среди всех генов, кодирующих HSP20, можно выделить кластер «универсального» ответа, поскольку абсолютно для всех генов, входящих в него (кроме генов японского вида), обнаружено резкое повышение экспрессии в ответ как на обезвоживание, так и на тепловой шок. Помимо «универсального» кластера, можно выделить кластеры, отличающиеся увеличением числа копий в определённых видах, и именно эти, потенциально видоспецифичные гены, демонстрируют резкое увеличение экспрессии в ответ на стресс. Во всех рассматриваемых видах было выявлено по 8 генов, кодирующих HSP70. Все гены *P. vanderplanki*, кодирующие HSP70, демонстрировали резкое увеличение уровня экспрессии к 48-му часу обезвоживания, и их уровень экспрессии почти возвращался к контрольному состоянию к 24-му часу восстановления. Других представителей семейства Chironomidae можно охарактеризовать более умеренным вовлечением генов семейства HSP70 в ответ на абиотический стресс. Наиболее «универсальным» вовлечением в ответ на абиотический стресс характеризуются цитоплазматические HSP70. Интересно, что в кластерах универсального ответа для HSP20 и HSP70 присутствует по одному гену японского вида, которые демонстрируют статистически значимое уменьшение экспрессии при тепловом шоке. В геномах исследуемых насекомых было найдено по 9 генов, кодирующих шаперонины HSP60. Все они оказались высоко гомологичны между видами. Гены этого семейства скорее вовлечены в ответ на обезвоживание, нежели на тепловой шок, поскольку их экспрессия увеличивалась только в образцах под этим абиотическим стрессом. Ни в одном эксперименте, связанным с нагревом, статистически значимого изменения экспрессии детектировано не было. В каждом из геномов было обнаружено по 3 гена, которые кодируют HSP90 – цитоплазматический, митохондриальный и белок, локализованный в эндоплазматическом ретикулуме. Если в случае «*Orthocladinae acuticauda*» и *P. tonnoiri* заметное увеличение экспрессии демонстрировал только ген, кодирующий цитоплазматический HSP90, то у ангидробиотического африканского вида все 3 гена отличались существенным увеличением экспрессии, причём экспрессия гена, кодирующего эндоплазматический HSP90, продолжала увеличиваться и после начала размачивания. Помимо генов, кодирующих белки теплового шока, в каждом из исследуемых видов были найдены гены, которые кодируют транскрипционный фактор HSF. Установлено, что во всех организмах (кроме *P. cf. tamanigrum*) уровень экспрессии гена, кодирующего HSF, повышается как при обезвоживании, так и после теплового шока. В результате поиска мотивов перед набором генов системы теплового шока было обнаружено статистически значимое обогащение мотива HSE для набора данных «*O. acuticauda*», *P. tonnoiri* и *P. vanderplanki*. В областях перед генами HSP *P. cf. tamanigrum* обогащения данного мотива не произошло, а был найден только мотив, напоминающий мотив связывания с белком со структурой цинковых пальцев ZNF282. Таким образом, несмотря на то, что отмечена высокая консервативность белков

теплового шока (и HSF) во всех четырёх рассматриваемых наборах аминокислотных последовательностей, серьёзные различия, которые наблюдаются между характером вовлечения соответствующих генов в ответ на тепловой шок, могут объясняться регуляцией.

**Обсуждение.** Ангидробионт *P. vanderplanki* при обезвоживании задействует практически весь спектр генов, которые кодируют белки теплового шока, и при этом локализация таких БТШ не ограничивается цитоплазмой, как, в целом, можно сказать о других экстремофильных, но не ангидробиотических исследованных личинках. Также установлено, что личинки того же рода, но принципиально отличающиеся от *P. vanderplanki* по экологии обитания, при тепловом шоке не демонстрируют увеличения ни одного из генов, кодирующих БТШ, хотя соответствующие кодирующие последовательности (возможно, за небольшой редукцией низкомолекулярных БТШ), присутствуют в геноме кислотнотолерантного *P. cf. tamanigrum*. В качестве объяснения этого феномена можно предложить отличный от остальных исследуемых видов механизм регуляции, поскольку, несмотря на то, что ген, кодирующий соответствующий фактор транскрипции HSF, в геноме присутствует и экспрессируется, перед предполагаемым стартом транскрипции генов, кодирующих БТШ, не было выявлено достоверного обогащения мотива его связывания.

**Заключение.** В данной работе впервые были собраны и проанализированы геномные последовательности трёх видов Chironomidae. Также была существенно улучшена сборка генома ангидробиотической личинки *Polypelidum vanderplanki*, что дало возможность получить новые данные о структуре её генов и их вовлеченности в ответ на обезвоживание. Так, для этого вида (а также для трёх других) впервые были проанализированы гены большинства белков теплового шока, а не отдельные представители этой группы, а использование методов сравнительной геномики и транскриптомики позволило сделать выводы об общих и видоспецифичных особенностях участия генов HSP в ответе на абиотический стресс.

#### Список литературы

1. B. Chen, M.E. Feder, L.Kang. Evolution of heat-shock protein expression underlying adaptive responses to environmental stress. *Molecular Ecology*. 2018; 27: 3040-3054.
2. M.J. Guertin, J.T. Lis. Chromatin landscape dictates HSF binding to target DNA elements. *PLoS Genetics*. 2010; 6: e1001114.
3. R. Cornette, O. Gusev, Y. Nakahara, S. Shimura, T. Kikawada, T. Okuda. Chironomid midges (Diptera, chironomidae) show extremely small genome sizes. *Zoological science*. 2015; 32: 248-254.
4. K. Watanabe, Sh. Imanishi, G. Akiduki, R. Cornette, T. Okuda. Air-dried cells from the anhydrobiotic insect, *Polypelidum vanderplanki*, can survive long term preservation at room temperature and retain proliferation potential after rehydration. *Cryobiology*. 2016; 73: 93-98.
5. O. Gusev, Y. Suetsugu, R. Cornette, T. Kawashima, M.D. Logacheva, A.S. Kondrashov, A.A. Penin, R. Hatanaka, S. Kikuta, S. Shimura, H. Kanamori, Y. Katayose, T. Matsumoto, E. Shagimardanova, D. Alexeev, V. Govorun, J. Wisecaver, A. Mikheyev, R. Koyanagi, M. Fujie, T. Nishiyama, S. Shigenobu, T.F. Shibata, V. Golygina, M. Hasebe, T. Okuda, N. Satoh, T. Kikawada. Comparative genome sequencing reveals genomic signature of extreme desiccation tolerance in the anhydrobiotic midge. *Nature Communications*. 2014; 5: 1-9.

*Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета среди ведущих мировых научно-исследовательских центров, федеральной целевой программы ФЦП 14.584.210002, проектов РНФ 17-44-07002 и 14-44-00022.*



# ПОДГОТОВКА ДАННЫХ ДЛЯ СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА СПЕКТРА МУТАЦИЙ В ГЕНАХ СЕМЕЙСТВА RAS ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

*Коньшева Д.Н., Власенкова Р.А., Серебрянский И.Г.*

Институт Фундаментальной Медицины и Биологии, К(П)ФУ

[daliya\\_1998@mail.ru](mailto:daliya_1998@mail.ru), +79503135757

**Введение.** Первичная обработка биомедицинских данных – важнейшая основа дальнейшего анализа и получения достоверных и статистически значимых результатов. Большую часть работы по характеристике мутаций, вызвавших развитие онкологического заболевания, составляет сбор информации из баз данных различных исследовательских институтов и приведение ее к единому виду. Колоректальный рак – третье самое диагностируемое онкозаболевание в мире, а также четвертая по частоте причина смерти от рака. За развитие этого типа опухоли среди прочих факторов отвечает возникновение мутаций в генах семейства Ras. Установление ключевых мутаций даст возможность корректировать лечение, а также повлиять на исход заболевания.

**Материалы и методы.** В ходе работы были использованы клинические и мутационные данные из 13 различных источников. Это материалы открытых баз биомедицинских данных cBioPortal, ICGC, а также данные, предоставленные международным проектом GENIE и приложения к научным публикациям электронного ресурса NCBI – PubMed. Сбор и унифицирование данных проводились при помощи программы Microsoft Excel. Для обработки собранной информации, а также графического отображения результатов был написан скрипт на языке программирования R.

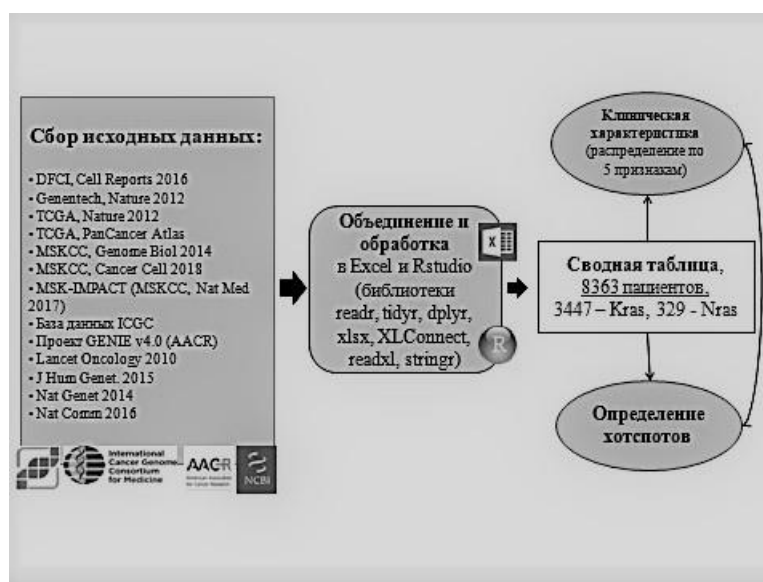


Рисунок 1. Схема проведенной работы

**Результаты.** Результатом проведенной работы стала сводная таблица с информацией о мутациях в генах KRAS (3447 образцов) и NRAS (329 образцов) и клинических показателях более восьми тысяч пациентов. Был проведен анализ распределения по пяти клиническим

признакам: полу, возрасту пациентов, положению опухоли (прямая кишка или ободочная; правосторонние отделы кишечника или левосторонние), а также статусу стабильности микросателлитной ДНК.

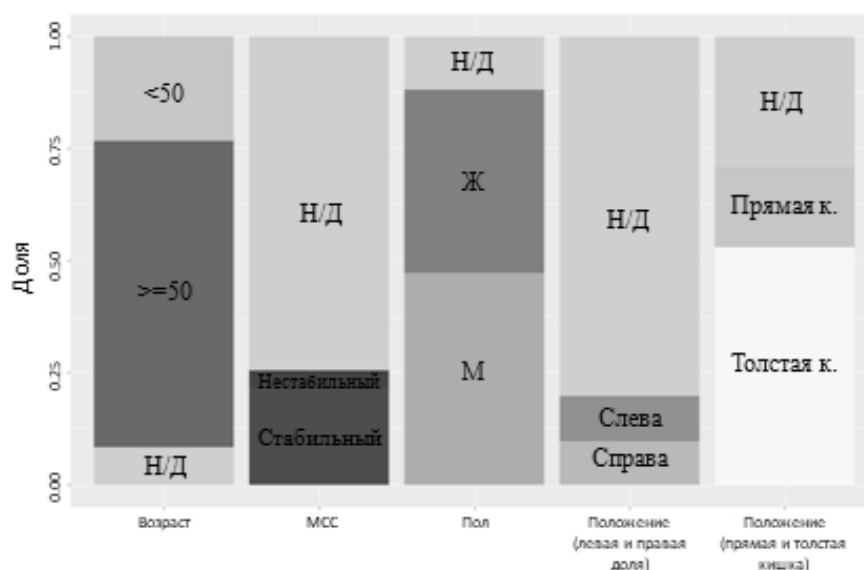


Рисунок 2. Клиническая характеристика 8363 пациентов, больных раком кишечника

Для исследуемых генов Kras и Nras была получена таблица наиболее «горячих» точек мутаций в данном типе рака – хотспотов. Для этого был использован скрипт, позволивший провести расчет биномиального распределения количества значимых мутаций.

Таблица 1. Двумерные хотспоты в генах Kras и Nras, встречающиеся в исследуемых образцах опухолей кишечника

Ген	Кодон	Частота	Мутации	Варианты замен	Статус
KRAS	12	2210	G12D;G12V;G12A;G12C;G12S;G12R;G12F	D:757 V:657 C:384 R:166 A:134 S:68 F:6 G:1 I:1 L:1	известен
KRAS	13	614	G13D;G13R;G13C;G13V	D:214 C:32 G:6 V:6 E:3 R:2 A:1	известен
KRAS	14	6	V14I;V14delinsGV	NA	неизвестен
KRAS	19	5	L19F	F:12	известен
KRAS	22	10	Q22K;Q22L;Q22R;Q22H	K:5 H:1	известен
KRAS	33	7	D33E	E:4	известен
KRAS	50	4	T50I;T50P	NA	неизвестен
KRAS	59	23	A59T;A59E;A59G	T:5 G:4 A:2 E:1	известен
KRAS	60	8	G60D;D60D;G60G;G60S;G60V	G:19 D:2 V:2 S:1	известен
KRAS	61	165	Q61R;Q61L;Q61H(C);Q61H(T);Q61K;Q61H;Q61P;Q61E	H:108 R:37 L:21 K:20 P:2 A:1 E:1	известен
KRAS	117	39	K117N;K117R;K117Q	N:17 R:1	известен
KRAS	146	218	A146T;A146V;A146P	T:65 V:16 P:5	известен
KRAS	161	5	R161R	NA	неизвестен
NRAS	12	93	G12A;G12D;G12C;G12S;G12R;G12V	D:41 C:11 S:8 A:6 V:5 R:3	известен
NRAS	13	31	G13R;G13V;G13D;G13C	R:18 D:16 S:3 C:2 F:1 V:1	известен
NRAS	61	155	Q61L;Q61R;Q61K;Q61H(C);Q61H	R:204 K:142 L:46 H:27 P:2 *:1	известен

**Обсуждение.** Анализ клинической характеристики пациентов показал большую встречаемость заболевания у представителей мужского пола, в возрастной группе старше 50 лет. Опухоль большей частью локализовалась в толстой кишке, однако ее положение не зависело от стороны. Согласно полученной генетической информации наиболее часто

встречающимися мутациями среди исследованных образцов явились замены в 12 кодоне в гене Kras (G12D) и замены в 61 кодоне в гене Nras (Q61L).

**Заключение.** В ходе настоящей работы было установлено соответствие клинической характеристики таковой в мире. Из пяти исследованных признаков наиболее значимые – пол и возраст: заболевание чаще характерно для пациентов мужского пола в возрасте старше 50 лет. Определены хотспоты, отвечающие за развитие колоректального рака. В дальнейшем планируется составить клиническую характеристику найденных в ходе анализа горячих точек мутаций и проверить различия с общей клинической картиной.

#### Список литературы

1. В.Л. Егошин, С.В. Иванов. Основы работы в программной среде R при анализе биомедицинских данных. Экология человека. 2018; 7: 55-64.
2. И.Н. Денисов. Колоректальный рак. Клинические рекомендации для врачей общей практики (семейных врачей). IV Конгресс врачей первичного звена здравоохранения Юга России, IX Конференция врачей общей практики (семейных врачей) Юга России, Ростов-на-Дону, 7 ноября 2014 г.
3. H. Kodaz. K-RAS and N-RAS mutations in testicular germ cell tumors. Bosnian journal of basic medical sciences. 2017; 17(2):159-163.

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ И ЛОКУСОВ ФИМБРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ БАКТЕРИЙ *KLEBSIELLA OXYTOCA* И *SERRATIA GRIMESII*

*Мишеева П.С.*<sup>1</sup>, *Гилязева А.Г.*<sup>2</sup>, *Марданова А.М.*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Кафедра микробиологии, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет

<sup>2</sup> НИЛ Микробные биотехнологии, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет

[p.misheeva@yandex.ru](mailto:p.misheeva@yandex.ru), +7(965)622-8375

**Введение.** Фимбрии являются одним из важнейших факторов вирулентности различных патогенов. Фимбрии I типа являются решающим фактором вирулентности *Escherichia coli* на первых этапах инфекции, опосредуя адгезию к эпителиальным клеткам, также необходимы для последующей колонизации [Muller *et al.*, 2009]. Гены синтеза и сборки фимбрий I типа организованы в *fim*-оперон. Фимбрии III типа способствуют образованию биопленок [Schroll *et al.*, 2010]. Фимбрии IV типа опосредуют адгезию и транслокацию через эпителиальные поверхности с помощью «twitching motility» [Mattick *et al.*, 1996]. В настоящее время молекулярные механизмы, лежащие в основе данной регуляции, недостаточно охарактеризованы.

**Материалы и методы.** При использовании базы данных NCBI из геномов бактерий *Escherichia coli* UTI89, *Klebsiella pneumoniae* CAV1392 и *K. oxytoca* JCo3 были получены последовательности геномного локуса, включающего регуляторную часть и структурные гены *fim*-оперона. Выравнивание геномных локусов с сопутствующим BLAST-анализом генов было произведено помощью программы EASYFIG. С помощью баз данных NCBI и

ASAP был произведен биоинформатический поиск генов различных типов фимбрий в геноме *Serratia grimesii* ATCC 14460.

Для исследования способности бактерий штаммов *S. grimesii* A2 и *K. oxytoca* NK-1 к адгезии использовали метод дрожжевой агглютинации и агглютинации эритроцитов морской свинки. Бактерии *S. grimesii* и *K. oxytoca* культивировали в среде LB при температурах 30°C и 37°C при аэрации (200 об/мин) в течение 24 часов. Оптическую плотность культуры измеряли при длине волны 600 нм на микропланшетном спектрофотометре BioRad XMark™ Microplate Spectrophotometer. Бактериальные культуры нормализовали, чтобы суспензии содержали примерно  $2.4 \times 10^8$  КОЕ, и центрифугировали при 15000 об/мин при 20°C в течение 1 минуты. Далее супернатант сливали, клетки ресуспендировали в 1 мл стерильного PBS. Для агглютинации использовали кровь морской свинки, разведенную в стерильном PBS в соотношении 1:4, и 2% дрожжевую суспензию в стерильном PBS.

На обезжиренном предметном стекле смешивали 30 мкл суспензии дрожжей или крови морской свинки и 30 мкл суспендированных бактериальных клеток и определяли время появления «хлопьев». В качестве контроля к 30 мкл суспензии дрожжей или крови морской свинки вносили 30 мкл PBS. Также исследовали влияние D-маннозы (1% раствор) на способность бактерий к агглютинации. На обезжиренном предметном стекле смешивали 30 мкл суспензии дрожжей или крови, 30 мкл суспендированных бактериальных клеток и 30 мкл раствора D-маннозы и также отмечали время появления «хлопьев».

**Результаты.** На рисунке 1 представлен результат сравнения геномных локусов, содержащих гены фимбрий I типа, в геномах *E. coli* UTI89, *K. pneumoniae* CAV1392 и *K. oxytoca* JCo3. В отличие от *E. coli*, структурная часть *fim*-оперона *K. pneumoniae* и *K. oxytoca* на 3'-конце содержит дополнительный ген *fimK*. Согласно данным литературы, при мочеполовых инфекциях продукт *fimK* гена подавляет синтез фимбрий I типа в клетках *K. pneumoniae*, в то время как при инфекциях дыхательных путей этот ген оказывает позитивный регуляторный эффект [Rosen *et al.*, 2016]. Кроме того, выявлены различия в регуляторной области геномного локуса: в геномах *E. coli* и *K. pneumoniae* перед структурной частью расположены гены рекомбиназ *fimB* и *fimE*, контролирующие экспрессию генов *fim*-оперона. Регуляторная область локуса *K. oxytoca* представлена единственным геном фермента интегразы, содержащей мотив «спираль-поворот-спираль».

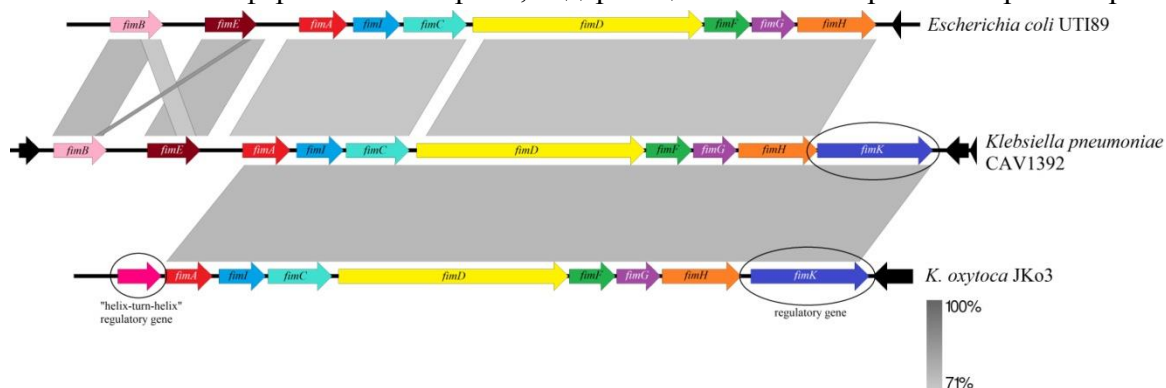


Рисунок 1 - *Fim*-опероны бактерий *E. coli* UTI89, *K. pneumoniae* CAV1392 и *K. oxytoca* JCo3. Гомологичные гены отмечены соответствующими цветами. В правом нижнем углу расположена шкала гомологии.

В геноме *S. grimesii* не обнаружены гены фимбрий I типа, но идентифицированы гены, ответственные за биосинтез фимбрий IV типа, в частности, ген главной субъединицы *pilE1* размером 450 п.о. Нуклеотидная последовательность *pilE1* обладала низкой степенью

гомологии к генам других энтеробактерий: 89% идентичности, но лишь на коротком отрезке (при покрытии 138 п.о./155 п.о.) с геном *S. marcescens* В3R3 размером 438 п.о., 81% идентичности (66 п.о./81 п.о.) к гену *K. pneumoniae* CAV1392 (432 п.о.), 90% (29 п.о./32 п.о.) – к гену *E. coli* UTI89 (441 п.о.), 88% (31 п.о./35 п.о.) – к гену *P. aeruginosa* 138244 (465 п.о.), 92% (25/27) – к гену *K. oxytoca* JKo3 (432 п.о.). Это указывает на выраженную видоспецифичность данного гена.

Бактерии *K. oxytoca* агглютинировали дрожжевые клетки в течение 15 с независимо от температуры культивирования. Однако установили, что температура культивирования бактерий по-разному влияла на чувствительность адгезии к D-маннозе: в случае роста бактерий при 30°C время агглютинации в присутствии маннозы увеличивалось в 2 раза в сравнении с контролем (до 30 сек), в то время как в случае роста бактерий при 37°C D-манноза не ингибировала агглютинацию, что свидетельствует о маннорезистентной адгезии и экспрессии фимбрий III-го типа.

Нами было показано, что бактерии *K. oxytoca*, выращенные на среде LB, не обладали способностью к агглютинации эритроцитов морской свинки, что свидетельствует о том, что бактерии экспрессируют только фимбрию III-типа.

Бактерии *S. grimesii* A2 эффективно агглютинировали дрожжевые клетки (4 с) независимо от температуры роста. Установили, что добавление D-маннозы ингибирует агглютинацию: время агглютинации увеличилось более чем в 3 раза (до 15 с) при обеих температурах. В отличие от *K. oxytoca*, бактерии *S. grimesii* A2 обладали ярко выраженной способностью к агглютинации эритроцитов морской свинки. Независимо от температуры роста бактерии агглютинировали их за 4-6 с. Добавление в реакционную суспензию D-маннозы приводило к значительному ингибированию скорости гемагглютинации, которое увеличивалось в 4-6 раз по сравнению с контролем.

**Обсуждение.** На мутантных штаммах *K. pneumoniae* и *E. coli* HB101 ранее было показано, что агглютинация эритроцитов морской свинки опосредуется только фимбриями I-го типа (чувствительными к D-маннозе), но не фимбриями III-го типа [Stahlhut *et al.*, 2012]. Тест с использованием эритроцитов морской свинки показал, что фимбрию I типа, идентифицированную в геноме бактерий *K. oxytoca*, фенотипически не проявляют в исследованных условиях. Вероятно, это объясняется иной структурой регуляторной области оперона фимбрий I типа у *K. oxytoca* в отличие с *E. coli* и *K. pneumoniae*. Как следствие, регуляция синтеза этих фимбрий у разных энтеробактерий может сильно различаться.

В геноме *S. grimesii* нами не были обнаружены гены, гомологичные генам фимбрий I типа других энтеробактерий. Однако *S. grimesii* способны к эффективной агглютинации эритроцитов морской свинки. Дополнительный биоинформатический поиск фимбриальных генов выявил присутствие в геноме *S. grimesii* генетических детерминант фимбрий IV типа, гены главной субъединицы которых среди разных видов бактерий довольно уникальны. Можно предположить, что в клетках *S. grimesii* фимбрию IV типа опосредуют способность бактерий *S. grimesii* к агглютинации эритроцитов морской свинки.

**Заключение.** Установили, что бактерии *K. oxytoca* не обладают способностью к агглютинации эритроцитов морской свинки, несмотря на присутствие в геноме оперона фимбрий I типа. Возможно, экспрессия данного оперона регулируется отличным от *E. coli* и *K. pneumoniae* путем, что приводит к отсутствию экспрессии фимбрий в условиях наших исследований. В то же время бактерии *K. oxytoca* способны к маннорезистентной агглютинации дрожжевых клеток, что свидетельствует о наличии на их поверхности

фимбрий III типа. Не смотря на отсутствие генетических детерминант, бактерии *S. grimesii* A2 способны к маннозочувствительной гемагглютинации эритроцитов морской свинки. Можно предположить, что в данном случае агглютинация опосредуется фимбриями IV типа, гены которых были обнаружены в геноме данного вида.

#### Список литературы

1. D.A. Rosen, J.K. Hilliard, K.M. Tiemann, E.M. Todd, S.C. Morley, D.A. Hunstad. *Klebsiella pneumoniae* FimK Promotes Virulence in Murine Pneumonia. *J Infect Dis.* 2016; 213: 649-658.
2. S.G. Stahlhut, C. Struve, K.A. Krogfelt. *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbriae agglutinate yeast in a mannose-resistant manner. *Journal of Medical Microbiology.* 2012; 61: 317-322.
3. C.M. Muller, A. Aberg, J. Straseviciene, L. Emody, B.E. Uhlin, C. Balsalobre. Type 1 Fimbriae, a Colonization Factor of Uropathogenic *Escherichia coli*, Are Controlled by the Metabolic Sensor CRP-cAMP. *PLoS Patog.* 2009; 5(2):e1000303.
4. C. Schroll, K.B. Barken, K.A. Krogfelt. Role of type 1 and 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 179.
5. J.S. Mattick, C.B. Whitchurch, R.A. Alm. The molecular genetics of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene.* 1996; 179: 1.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 18-34-00837 мол\_а.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НЕОТЛОЖНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ИНСУЛЬТАМИ И ИНФАРКТАМИ

Казимиров П.В., Акберова Н.И.

Университетская клиника Казанского (Приволжского) федерального университета, КДЛ № 2 (клинико-биохимическая),  
Кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии ИФМиБ

Контактная информация ([shirohebi@bk.ru](mailto:shirohebi@bk.ru) , +79625636828)

### Введение

По данным всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в настоящее время инсульты занимают 2 место по частоте смертности, уступая только ишемической болезни сердца [1]. При этом диагностика инсультов, в том числе дифференциальная, зачастую бывает затруднена, особенно в условиях недоступности компьютерной томографии или ангиографии, которые являются основными диагностическими методами. Несмотря на то, что в клинических рекомендациях отмечается достаточно низкая прогностическая и диагностическая значимость биохимических показателей крови, поскольку первоочередная задача лабораторной диагностики – выявление сопутствующей патологии, которая может повлиять на состояние пациента с инсультом, они имеют уровень убедительности рекомендаций А (уровень достоверности доказательств 1). В дифференциальной диагностике инсультов необходимо использовать сочетание нескольких методов и показателей, в т.ч. биохимических показателей крови, что позволит повысить точность диагностики и прогнозировать выживаемость пациентов в постинсультном периоде.

Целью исследования являлся поиск ключевых маркеров, позволяющих найти достоверные различия между лабораторными показателями у пациентов с разными формами инсультов, а также поиск связей между лабораторными показателями и патологией пациента.

## Материалы и методы

Исследование проводилось на базе университетской клиники Казанского (Приволжского) федерального университета. Для проведения исследования были использованы данные лабораторных показателей пациентов, проходивших лечение в 2018-19 гг, при этом для анализа использовались показатели биохимического анализа крови и коагулограммы, сделанные при поступлении в больницу, чтобы исключить влияние лекарственной терапии, а также врачебного вмешательства.

В работе исследовали показатели биохимического анализа крови и коагулограммы 160 пациентов, разделённых на 3 группы в соответствии с диагнозом: целевая группа (100 человек), госпитализированных с диагнозом «другой инфаркт мозга» (I63.8 по МКБ-10), группа сравнения (30 пациентов, госпитализированных с диагнозом «внутричерепное кровоизлияние неуточнённое» (I61.9 по МКБ-10) и группа сравнения пациентов (30 человек) с диагнозом «острый трансмуральный инфаркт передней стенки миокарда» (I21.0 по МКБ-10) [2].

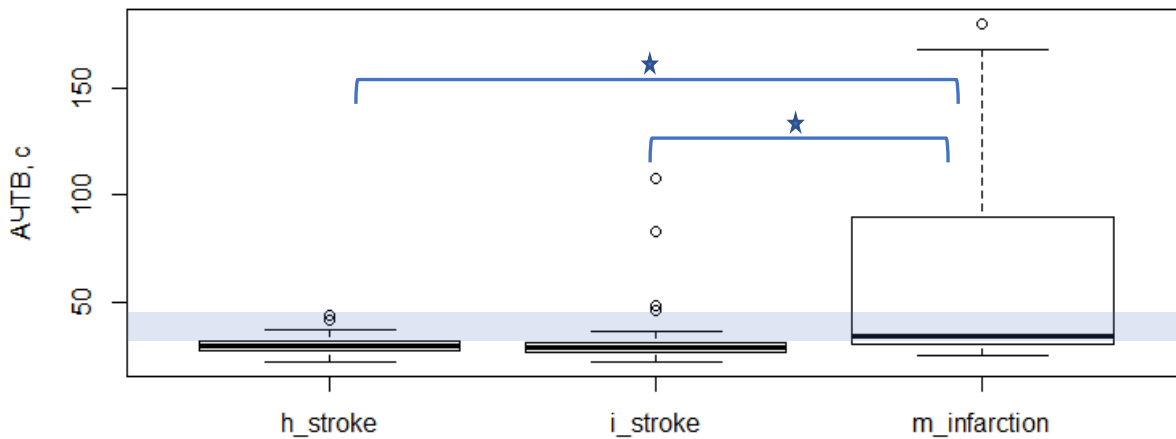
Было проведено исследование следующих показателей биохимического анализа крови: глюкоза (ммоль/л), общий белок (г/л), холестерин сыворотки крови (ммоль/л), АЛТ (Ед/л), АСТ (Ед/л), общий билирубин (мкмоль/л), мочеви́на (ммоль/л), креатинин (мкмоль/л), КФК (Ед/л), ЛДГ (Ед/л), калий (ммоль/л), натрий (ммоль/л), хлор (ммоль/л); коагулограммы: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ, с), международное нормализованное отношение (МНО), протромбиновое время (ПТ, с), процент протромбина по Квику, фибриноген (г/л).

Статистическая обработка данных производилась с использованием статистической среды R в программе RStudio с использованием методов непараметрического анализа. Для оценки уровня достоверности были использованы критерии Манна-Уитни и Краскелла-Уоллиса. Для описания показателей в группах использовали медиану, 1-ый и 3-ий квартили, для графического представления – боксплоты, на которых значимые различия между группами отмечены звездочками ( $p < 0,05$ ), референсный диапазон значений показан серым цветом.

## Результаты

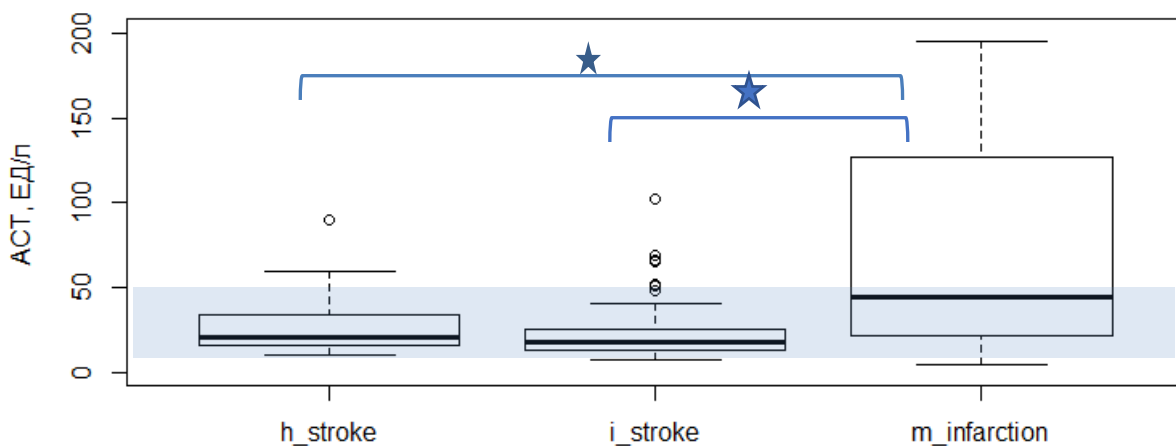
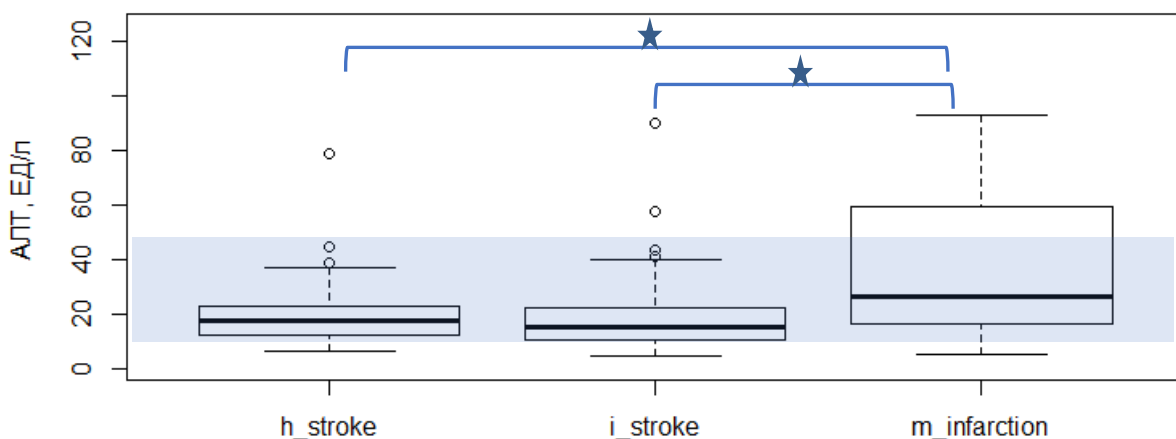
В ходе исследования были получены результаты лабораторных исследований крови пациентов с другим инфарктом мозга (i\_stroke), внутричерепным кровоизлиянием (h\_stroke) и острым инфарктом миокарда (m\_infarction).

Анализ данных выявил, что АЧТВ у пациентов из первой и второй групп достоверно ниже, чем у пациентов из третьей группы (30,53 с и 30,61 с против 61,99 с на уровне значимости  $p < 0,05$ ) (Рис.1).



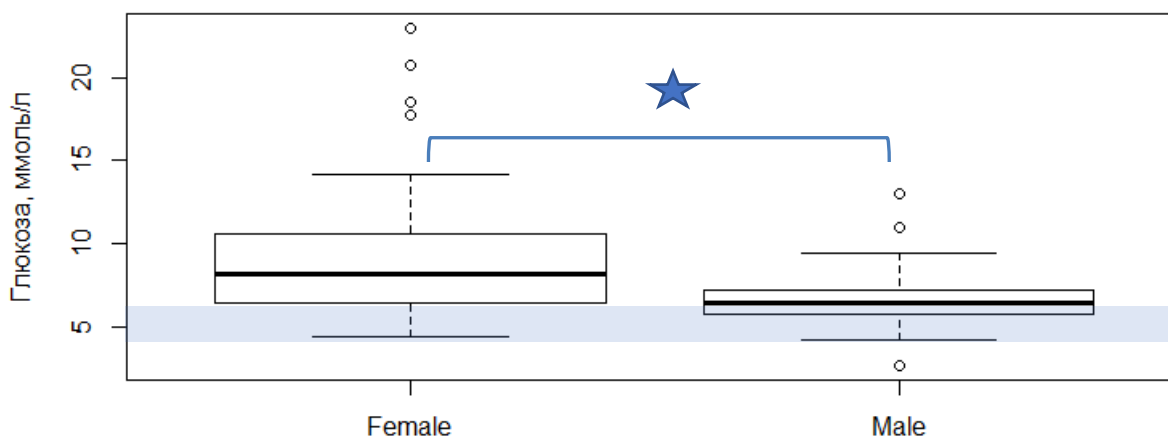
Достоверных различий по таким показателям, как общий белок, общий билирубин, мочеви́на, креатинин, электролиты сыворотки крови (Na, K, Cl), холестерин не выявлено. Между показателями коагулограммы (МНО, протромбиновое время, общий фибриноген и протромбин по Квику) тоже не обнаружено статистически значимых различий.

Уровень АЛТ и АСТ у пациентов из первой и второй группы достоверно ниже, чем у пациентов с инфарктом (22,373 и 20,52 ЕД/л против 68,63 ЕД/л для АЛТ и 29,25 ЕД/л и 26,62 ЕД/л против 118,45 ЕД/л для АСТ соответственно при  $p < 0,05$ ) (Рис. 2 и 3), при этом у пациентов с разными формами инсульта значимой разницы не обнаружено, и уровни АЛТ и АСТ в этих группах лежат в референсном диапазоне значений.



Статистических различий в уровне глюкозы между группами не обнаружено, однако, при анализе данных в целевой группе было выявлено, что уровень глюкозы у женщин, поступивших в больницу с диагнозом «другой инфаркт мозга» выше, чем у мужчин с тем же диагнозом (9,06 ммоль/л у женщин против 6,73 ммоль/л у мужчин при  $p < 0,05$ ) (Рис. 4).





Различия между группами по активности ЛДГ и КФК нельзя назвать достоверными из-за малого количества данных показателей в выборке.

### Обсуждение

Достоверно более высокий уровень АЧТВ у пациентов с инфарктом миокарда может быть обусловлен либо высоким риском кровотечения у пациентов, либо приёмом антикоагулянтных препаратов с целью профилактики тромбообразования. Достоверно более высокая активность АЛТ и АСТ у пациентов с инфарктом миокарда обусловлена ишемическим поражением мышечной ткани сердца, которая содержит гораздо больше данных ферментов, нежели ткани мозга. Достоверные гендерные различия по уровню глюкозы в целевой группе говорят о том, что женщины более подвержены инсультам, нежели мужчины, поскольку более высокий уровень глюкозы является фактором риска возникновения ишемических инсультов.

### Заключение

Сравнительный анализ неотложных показателей коагулограммы и биохимии крови у пациентов с различными формами инсультов и инфарктом миокарда выявил значимое различие в уровне АЧТВ, активности АЛТ и АСТ у пациентов с инфарктом миокарда и различными формами инсультов. В то же время, между группами пациентов с инсультами значимых отличий в лабораторных показателях не обнаружено.

В группе пациентов с другим инфарктом мозга уровень глюкозы у женщин достоверно выше, чем у мужчин, что предполагает у них более тяжелое течение данной патологии.

1. Всемирная организация здравоохранения <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
2. Международная классификация болезней <https://mkb-10.com/>

## Секция «Биотехнология и бионанотехнология»

### БИОДЕГРАДАЦИЯ И ТОКСИЧНОСТЬ БЕЛОГО ФОСФОРА

Акосах Й.А. <sup>1\*</sup>, Миндубаев А.З. <sup>2</sup>, Бабынин Э.В. <sup>1</sup>, Бадеева Е.К. <sup>2</sup>, Минзанова С.Т. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18.

<sup>2</sup> Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, 420088, ул. Арбузова 8, г. Казань, Россия.

E-mail: [mindubaev@iopc.ru](mailto:mindubaev@iopc.ru); [mindubaev-az@yandex.ru](mailto:mindubaev-az@yandex.ru)

Нами впервые произведены посевы микроорганизмов в культуральные среды, содержащие белый фосфор в качестве единственного источника фосфора [1]. В данных средах микроорганизмы росли и не испытывали фосфорное голодание (рис.). Это первый в мире пример включения белого фосфора в биосферный круговорот элемента фосфора. Самая высокая концентрация соответствует превышению ПДК белого фосфора в сточных водах в 5000 раз, а в водах хозяйственно-бытового назначения – в сто миллионов раз [2]!

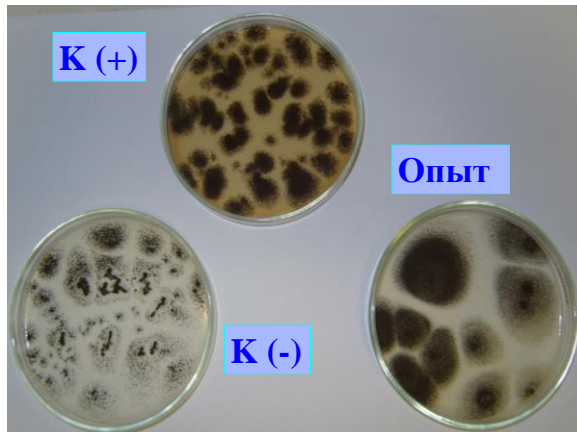


Рис. Посев устойчивых грибов *A. niger*. К(+)<sup>1</sup> – среда с фосфатом: наблюдался рост 49 спорообразующих колоний *A. niger*. К(-)<sup>2</sup> – среда без источника фосфора: на ней наблюдался рост 33 ослабленных колоний. Опыт – среда с 0.05% белого фосфора: наблюдался рост 11 крупных спорообразующих колоний *A. niger*. Чашки сфотографированы через шесть суток после посева.

Посев *A. niger* AM1 в среду, содержащую сразу два источника фосфора (фосфат и белый фосфор) продемонстрировал, что Р<sub>4</sub> не проявляет токсические свойства по отношению к этому микроорганизму. В присутствии белого фосфора он растет с такой же скоростью, как в

его отсутствии. Это единственный пример отсутствия токсичности белого фосфора для живого организма.

Проведена оценка генотоксичности белого фосфора при помощи SOS-lux теста, которая продемонстрировала ее наличие [3]. Этот результат получен впервые – во всех найденных нами источниках сообщается об отсутствии генотоксических свойств у белого фосфора. Белый фосфор проявляет слабую мутагенную активность. Мы впервые исследовали негативное влияние белого фосфора на клеточный цикл эукариот методом Allium теста. Оказалось, что белый фосфор даже в очень низких концентрациях, порядка 0.01%, на порядок увеличивает количество хромосомных aberrаций.

1. Миндубаев А.З., Акосах Й.А., Алимова Ф.К., Афордоаньи Д.М., Болормаа Ч., Кагиров Р.М., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Яхваров Д.Г. О разложении белого фосфора осадком сточных вод // Учен.зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2011. Т.153. № 2. С.110-119.
2. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Хаяров Х.Р., Минзанова С.Т., Яхваров Д.Г. Микробиологическая деградация белого фосфора // Экология и промышленность России. 2018. Т. 22. № 1. С. 33-37. DOI: 10.18412/1816-0395-2018-1-33-37
3. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Пискунов Д.Б., Махиянов А.Н., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Волошина А.Д. Генотоксичность и цитогенетическое действие белого фосфора // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т.9. №1. С. 81-94. DOI: <http://dx.doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-1-81-94>

### **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЦР ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ГЕНОМОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЛИСТЕРИОЗА И РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

\* Асхатова Н.А., \*Лартон Р.Р., \*Алимов А.М., Осянин К.А., Хаммадов Н.И., Фаизов Т.Х.

\* ФГБОУ Казанская ГАВМ

ФГБНОУ «ВЦТРБ»- ВНИВИ (г.Казань)

[azat36alimov@mail.ru](mailto:azat36alimov@mail.ru)

Вирусные инфекции дыхательных путей в настоящее время являются одними из самых распространенных болезней среди крупного рогатого скота (КРС). Заболеваемость и гибель животных от этих инфекций не только снижается, а продолжает расти [1]. Среди возбудителей, вызывающих острые респираторные заболеваний КРС, выделяют респираторно - синцитиальный вирус, вирус парагриппа, вирусной диареи – болезни слизистых оболочек и бактериальные инфекции [2]. Наиболее распространенными респираторными болезнями КРС являются инфекционный ринотрахеит (ИРТ), парагрипп – 3 (ПГ-3) и вирусная диарея (ВД).

Листерия – широко распространенная зоонозная болезнь, проявляющаяся разнообразной клиникой [3]. Возбудитель листериоза – полиморфная грамположительная палочка, спор и капсул не образует, но обладает высокой устойчивостью во внешней среде [4].

Диагностику вирусных и бактериальных инфекций проводят вирусологическими и микробиологическими методами, направленными на выделение возбудителей. Данные исследования трудоемки и не всегда успешны. Поэтому совершенствование методов индикации возбудителей инфекционных болезней остается актуальной проблемой. В этом аспекте большой интерес представляет полимеразная цепная реакция (ПЦР). Для ПЦР важное значение имеет выявление нуклеотидных последовательностей наиболее консервативных и специфичных участков геномов возбудителей и конструирование соответствующих праймеров, обеспечивающих их амплификацию [5]. В настоящее время наиболее перспективным экспресс методом считается мультиплексная ПЦР в реальном времени [6,7].

Для успешного и широкого применения методов ПЦР необходимы дальнейшие скрининговые исследования путем сравнения результатов ПЦР с данными вирусологических и микробиологических анализов.

Целью работы явилась оценка эффективности ПЦР при индикации возбудителя листериоза и установление возможности конструирования праймеров и зондов для мультиплексной ПЦР для детекции возбудителей отдельных вирусных респираторных инфекций крупного рогатого скота.

**Материалы и методы.** ПЦР при индикации листерии проводили с праймерами L1 и L2, мишенью которых является ген *hly A*, продукт которого листериолизин относится к одному из факторов вирулентности. Эти праймеры амплифицируют участок в генах *hly A*, состоящей из 174 пар нуклеотидов. ПЦР проводили в амплификаторе «Герцик» (Россия).

При разработке мультиплексной ПЦР для поиска праймеров и зондов пользовались базой данных Национального центра биологической информатизации (NCBI), BLAST и программой Vector NTi 9.1.0 (Invitrogen Corporation) Для мультиплексной ПЦР сконструировали положительный контроль, представляющий из себя комплиментарную последовательность олигонуклеотидным затравкам искомым вирусам. Мультиплексную амплификацию проводили на анализаторе «iCycler Ia5 (Biorad, США).

Для выявления генетического полиморфизма и консервативных фрагментов геномов возбудителей ИРТ, ПГ-3 и ВД использовали собственный банк геномов, состоящий от 7 до 14 изолятов каждого вида возбудителя.

**Результаты** . ПЦР с праймерами L1, L2 во всех случаях с искусственно контаминированными листериями первого и второго серогрупп объектов была положительной. После электрофореза в 1,2% агарозном геле, содержащем этидий бромид, выявлялся один фрагмент, состоящий из 174 пар нуклеотидов. Чувствительность ПЦР составляла 10 микробных клеток (м.к) в одном мл исследуемого объекта. Результаты ПЦР полностью совпадали с данными бактериологических исследований. Однако, при бактериологических исследованиях сроки анализов составляли 3-10 суток, а в ПЦР – 4 часа.

На основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей исследуемых вирусов были установлены наиболее консервативные локусы у каждого вида возбудителя, которых использовали в качестве маркерных фрагментов. К ним были созданы праймеры и зонды, которых применяли для генетической идентификации возбудителей ИРТ, ПГ-3, ВД. В качестве внутреннего положительного контроля амплификации использовали ген каппа-казеина. На основании результатов моно тест-систем ПЦР с вирусами ИРТ, ПГ-3 и ВД было установлено, что максимальная эффективность амплификации ДНК проявлялась у следующих комплексов олигонуклеотидных затравок: PG3 F, VDV 1, HV-1F соответственно.

Оптимальной температурой отжига для всех из них оказалось 56 °С, что дало возможность реализации проведения сочитанной тест-системы в мультиплексном формате. Для контроля амплификации (положительный контроль) был проведен дизайн и синтез концевых участков ДНК (плазмид), включающие в себя амплифицируемые последовательности ДНК.

Условия проведения мультиплексной ПЦР были те же, что и при одиночной ПЦР: 94°С (горячий старт) – 5мин, затем (40 циклов): 95°С - 5 с, 56 °С -30 с, 72 °С – 20 с. После 40 циклов амплификации достигалась положительная реакция со всеми тремя видами искомым возбудителей. Чувствительность тест-системы определяли путем десятикратных разведений препаратов плазмидных ДНК для индикации возбудителей ИРТ, ПГ-3 и ВД. Стабильная амплификация наблюдалась при разведении  $10^{-18}$ , что соответствует 1-2 геному плазмидной ДНК

**Обсуждение.** ПЦР с праймерами L1и L2, амплифицирующими участок гена Hly A возбудителя листериоза, обеспечивала надежную индикацию возбудителя независимо от антигенных различий штаммов листерий с чувствительностью 10м.к. в 1 мл.

На основании сравнительного анализа выявлены наиболее консервативные участки геномов искомым вирусом. Смесь созданных олигонуклеотидных последовательностей затравок при взаимодействии с соответствующим ДНК-маркерам не препятствовала амплификации других маркерных ДНК. При этом каждому биологическому патогену соответствовала индивидуальная флюорисцентная зона метки: вирусу диареи соответствовал канал R6G, парагриппа-канал Fam инфекционного ринотрахеита-Cy5.

**Заключение.** Полимеразная цепная реакция позволяет проведение эффективной индикации возбудителя листериоза. Созданные праймеры и зонды, разработанный режим ПЦР обеспечивали надежность проведения мультиплексной ПЦР по выявлению геномов возбудителей ИРТ, ПГ-3 и ВД высокой чувствительностью и специфичностью.

#### *Список литературы*

1. Петрова, О.Г. Респираторные заболевания животных и птиц с учетом экологических особенностей территории /О.Г. Петрова и др. – Екатеринбург, 228 с.
2. Алексеев, А.Д. Респираторно-синцитиальная инфекция и ее роль в патогенезе острых респираторных заболеваний кр.ро.скота /А.Д. Алексеев, О.Г. Петрова, Л.И. Дроздова // Medicus – 2016. - № 3. – С. 31-33.
3. Бакулов, И.А. Листерии и листериоз / И. А. Бакулов, Д.А. и др. - Ульяновск : УГСХА", 2008. – 168 с.
4. Тартаковский, И.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика /И.С. Тартаковский. – Медицина для всех – 2002. – 200с.
5. Зорина В.В. ДНК – Технология. Электронный ресурс: [www.dna – technology.ru](http://www.dna-technology.ru)
6. Парфенова, Т.В. Возможность ПЦР – диагностики инфекций мочевыводящих путей, вызванных бактериальными возбудителями / Т.В. Парфенова, и др. // Лабораторная диагностика. Спецвыпуск №5 – 2014 «Лаборатория ЛПУ» - С.50 -56.
7. Калмыкова, М.С. Основы полимеразной цепной реакции с разными форматами детекции / М.С. Калмыкова. Учебное пособие для вузов. СПб.: Лань. – 2009. – 80с.

# ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СЕКРЕЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ГИСТИДИНОВОЙ КИСЛОЙ ФИТАЗЫ ДРОЖЖАМИ *PICHLIA PASTORIS*

*Д.С.Бульмакова, И.В.Чибарева, А.Д.Сулейманова*

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

[dashunka@mail.ru](mailto:dashunka@mail.ru), +7 927 677 83 34

**Введение.** В современной индустрии кормления проблема недостатка усвояемого фосфора стоит остро и обусловлена тем, что большая часть фосфора в кормовом зерне содержится в форме нерастворимых и неусвояемых фитатов. Будучи солью стереоизомера мио-инозитола с замещенными гидроксильными группами на фосфаты, фитат является сильным хелатирующим агентом и, проходя транзитом через кишечный тракт животных с однокамерным желудком, связывается с ионами двухвалентных металлов и белками, образуя нерастворимые комплексы. Микробные ферменты фитазы, способны расщеплять фитат и поэтому могут быть использованы в качестве кормовых добавок. Использование ферментов в промышленности подразумевает масштабирование процессов их синтеза путем создания эффективных систем экспрессии. С целью получения рекомбинантных белков широко используются дрожжи *Pichia pastoris* [1], которые характеризуются высоким уровнем экспрессии за счет сильных и регулируемых промоторов, а также подбора эффективных сигнальных пептидов (SP) [2]. Целью работы явилось изучение влияния различных сигнальных пептидов на эффективность секреции бактериальной гистидиновой кислоты фитазы AgpP *Pantoea* sp. 3.5.1 дрожжами *Pichia pastoris*.

**Материалы и методы.** В работе использовали полученные ранее рекомбинантные штаммы *E.coli* с конструкциями pPINK-НС/ $\alpha$ -amyl/agpP, pPINK-НС/ $\alpha$ -fact/agpP и pPINK-НС/ $\alpha$ -inul/agpP, содержащими ген бактериальной фитазы AgpP *Pantoea* sp. 3.5.1. Для трансформации конструкций использовали беспротезазный штамм *Pichia pastoris* PichiaPink4 (Invitrogen). Штамм является ауксотрофом по аденину и не способен расти при его отсутствии в среде. Интеграция в геном дрожжей экспрессионных конструкций позволяет ему расти на среде без аденина. Трансформацию дрожжей проводили методом электропорации. Отбор трансформантов осуществляли на среде PAD. Для анализа проводили ПЦР с колоний. Способность трансформированных штаммов *P. pastoris* экспрессировать и секретировать фитазу в культуральную жидкость оценивали с помощью вестерн-блоттинга и анализа фитазной активности. Для этого проводили культивирование рекомбинантных штаммов дрожжей на среде VMGY и VMMY. Экспрессию фитазы индуцировали метанолом каждые 24 часа роста культуры в течение 3 суток. Каждые 12 часов проводили отбор культуры. Для анализа использовали культуральную жидкость дрожжей и внутриклеточный лизат.

**Результаты.** Получены рекомбинантные штаммы *P. pastoris*, несущие ген бактериальной фитазы *agpP* под контролем индуцибельного дрожжевого промотора AOX1 с сигнальными пептидами генов  $\alpha$ -амилазы *Aspergillus niger*,  $\alpha$ -фактора *Saccharomyces cerevisiae* и инулиназы *Kluyveromyces fragilis*. Результат вестерн-блоттинга и анализа фитазной активности культуральной жидкости трансформантов подтвердил, что бактериальная фитаза *Pantoea* sp. 3.5.1 экспрессируется в дрожжевых клетках на уровне

трансляции и секретируются в культуральную жидкость. Способность сигнальных пептидов генов инулиназы, альфа-амилазы и альфа-фактора влиять на секрецию бактериальной фитазы рекомбинантными дрожжами оценивали путем измерения внеклеточной и внутриклеточной фитазной активности. Среди дрожжей, трансформированных конструкцией, содержащей SP гена инулиназы, максимальное значение фитазной активности внеклеточного и минимальное значение внутриклеточного белка пришлось на 48-й час роста культуры ( 2.58 ед./мл и 0.465 ед./мл, соответственно). Дрожжи, содержащие SP гена альфа-фактора, максимальное значение внеклеточной фитазной активности и минимальное внутриклеточной проявили на 60-й час роста (2.27ед./мл и 0.563ед./мл, соответственно). Дрожжи, несущие SP гена альфа-амилазы наиболее высокое значение фитазной активности внеклеточного белка и минимальное значение внутриклеточного проявили на 48-й час роста (2.14 ед./мл и 0.51 ед./мл соответственно). Данные фитазной активности трансформантов по выбранным временным точкам (когда отмечалось минимальное значение внутриклеточного белка и максимальный выход внеклеточного) подтверждали вестерн-блоттингом. Показано, что максимальный выход фитазы за пределы клетки наблюдался у трансформантов, содержащих SP гена инулиназы, процентное соотношение внеклеточного и внутриклеточного белка которого соответствовал 85% и 15%, соответственно.

**Обсуждение.** В работе использовали гистидиновую кислую фитазу бактерии *Pantoea* sp. 3.5.1. Фермент обладает широкой субстратной специфичностью по гидролизу таких фосфорилированных соединений, как фитат, глюкозо-1-фосфат и глюкозо-6-фосфат. рН-стабильность фермента находится в пределах 3.0 – 6.0, рН-оптимум составляет 4.5. Стабильность фермента сохраняется в пределах 10-45°C с оптимумом 37°C [3]. Широкие пределы рН, в которых поддерживается активность фермента, потенциально позволяют использовать фитазу *Pantoea* sp. 3.5.1 в качестве добавки к кормам животных. Для промышленного использования ферментов процессы их синтеза и получения должны быть масштабированы. Преимуществом пользуются дрожжевые системы экспрессии, в частности, дрожжи *Pichia pastoris*. Как эукариотам, им свойственны процессинг и фолдинг белков, а также осуществление таких посттрансляционных модификаций, как гликозилирование. Кроме того, дрожжи *P.pastoris* обеспечивают эффективную секрецию белков, а их культивирование не требует дорогостоящих сред и оборудования [4]. Поскольку наиболее популярным и часто используемым SP для секреции гетерологичных белков дрожжами является SP гена альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae*, предшественника феромона, было интересным провести сравнительный анализ его эффективности наряду с другими SP – гена альфа-амилазы *Aspergillus niger* и инулиназы *Kluyveromyces fragilis*. Однако нами показано, что максимальный выход фитазы AgpP *Pantoea* sp. 3.5.1 при секреции рекомбинантными дрожжами *P.pastoris* наблюдался у трансформантов, содержащих SP гена инулиназы, по сравнению с SP генов альфа-амилазы и альфа-фактора.

**Заключение.** Наиболее эффективным сигнальным пептидом для секреции бактериальной гистидиновой кислой фитазы AgpP *Pantoea* sp. 3.5.1 дрожжами *Pichia pastoris* является сигнальный пептид гена инулиназы *Kluyveromyces fragilis*.

#### Список литературы

1. P.P. Jacobs, S. Geysens, W. Vervecken, R. Contreras, N. Callewaert. Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. Nat Protoc. 2009; 4;58–70.

2. P. Geoff, M. Stark, D. Kim, J. Chang, N. Shaheen, H. Poerwanto, K. Agari, P. Moua, L. K. Low, N. Tran, A.D. Huang, M. Nattestad, K.T. Oshiro, J.W. Chang, A. Chavan, J.W. Tsai, J. Lin-Cereghino. The Effect of  $\alpha$ -Mating Factor Secretion Signal Mutations on Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Gene*. 2013; 519(2): 311-317.

3. A.D. Suleimanova, A. Beinhauer, L.R. Valeeva, I.B. Chastukhina, N.P. Balaban, E.V. Shakirov, R. Greiner, M.R. Sharipova. Novel glucose-1phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5.1. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015; 81(19): 6790 – 6799.

4. S.R. Hamilton, T.U. Gerngross. Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007; 18(5): 387-392.

*Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РНФ № 16-16-04062.*

## **ПОЛУЧЕНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *L14* И *RSFS* У *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ДЛЯ АНАЛИЗА РОЛИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ В ФОРМИРОВАНИИ ГЕТЕРОДИМЕРА *L14/RSFS*.**

*Валиахметов Э.Э., Фатхуллин Б.Ф., Аль Шебель А., Валидов Ш.З*

*НИЛ Структурной биологии, Институт фундаментальной медицины и биологии, КФУ*

[emlvaliakhmetov@gmail.com](mailto:emlvaliakhmetov@gmail.com) тел89172250243

**Введение.** Рибосома – центральный элемент белкового синтеза, для сборки которой необходимо более сотни белков и 3 (4) молекулы рРНК. В состоянии покоя бактериальной клетке необходимо снизить интенсивность синтеза белка, что достигается, в том числе, и путем инактивации рибосом и их хранения в виде димеров, 70S частиц или отдельных рибосомных субъединиц. В таком виде рибосомы теряют функциональность лишь временно, то есть могут быть возвращены в процесс трансляции при восстановлении благоприятных условий окружающей среды (Prossliner et al., 2018). Белок RsfS (ribosome silencing factor) фактор сайлинсинга рибосомы обнаружен у всех эубактерий и в хлоропластах растений. Взаимодействуя с белком L14 он связывается с большой субъединицей рибосомы и препятствует ее взаимодействию с 30S субъединицей, что предотвращает сборку 70S рибосомы (Li et al., 2015).

Целью данной работы было получение мутантных белков *Staphylococcus aureus* L14 и RsfS для анализа роли аминокислотных остатков в формировании гетеродимера.

**Материалы и методы.** В работе были использованы штаммы *E. coli* DH5 $\alpha$  и BL21 (DE3) pLys, которые выращивали на питательных средах LB и 2xYT. При необходимости к средам добавляли канамицин и хлорамфеникол в концентрации 50 мкг/мл и 25 мкг/мл, соответственно.



Для сайт-направленного мутагенеза использовали плазмиду pACYCduet1(Km<sup>R</sup>):14his-rsfS и праймерные олигонуклеотиды, разработанные для изменения нуклеотидной последовательности генов *l14* и *rsfS*.

Исходные и мутантные белки экспрессировали в штамме *E. coli* BL21 (DE3) pLys в питательной среде с добавлением индуктора ИПТГ. Белки из осветленных лизатов экстрагировали с помощью афинной хроматографии с сорбентом Ni-NTA. Для оценки эффективности выделения белков использовали электрофорез белков в ПААГ и анализ представленности белков проводили с помощью программы QuantityOne (Biorad, США).

**Результаты.** Анализ кристаллической структуры выявил аминокислотные остатки, которые могут быть критичны для формирования гетеродимера L14/RsfS. Произведена замена заявленных аминокислот методом сайт-направленного мутагенеза (Таблица 1).

Таблица 1. Замена аминокислот, принимающих участие в формировании связи.

RsfS	L14
Замена глутаминовой кислоты (-) на аланин (+) в 70 позиции (E70A)	Замена лизина (-) на аланин (+) в 113 позиции (K113A)
Замена аспарагиновой кислоты (-) на аланин (+) в 81 позиции (D81A)	Замена аргинина (-) на аланин (+) в 107 позиции (R107A)
Замена тирозина (-) на аланин (+) в 98 позиции (Y98A)	Замена аргинина (-) на аланин (+) в 97 позиции (R97A)
Замена триптофана (0) на глутаминовую кислоту (-) в 77 позиции (W77E)	Замена лейцина (0) на глутаминовую кислоту (-) в 77 позиции (L117E)

Произведена экспрессия мутантных белков L14 и RsfS в штамме *E. coli* BL21 (DE3) pLys, белки данного комплекса были выделены и очищены. Результаты очистки исходных и мутантных белков показаны на Рисунке 1. Дорожка №10 содержит дикий тип белков L14-his и RsfS. В дорожках со 2 по 9 содержатся мутантные белки с измененным соотношением L14-his/RsfS, что показывает влияние аминокислотных замен на взаимодействие двух белков.

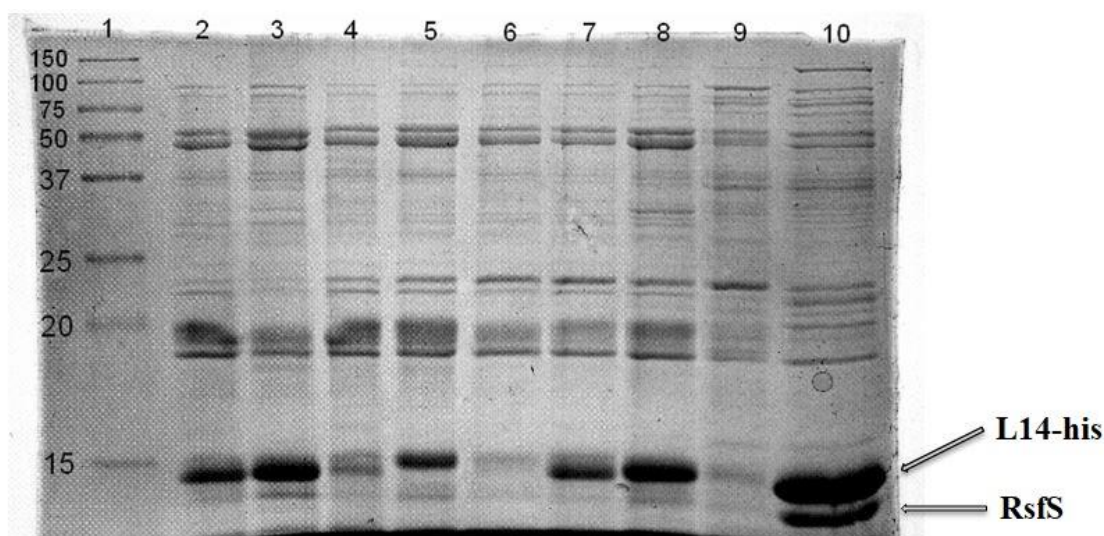


Рисунок 1. Результат электрофореза белков в ПААГ после выделения на сорбенте Ni-NTA. Дорожка 1 – Маркер, 2 - R97A, 3 - R107A, 4 – K113A, 5 - L117E, 6 - D81A, 7 - E70A, 8 - Y98A, 9 - W77E, 10 – Дикий тип L14-his/RsfS-his.

**Обсуждение.** Для гетерологической экспрессии ген *rsfS* из *Staphylococcus aureus* был клонирован, однако выделение RsfS затруднялось из-за плохой растворимости белка, а также негативного влияния на рибосомы *E. coli*. Для лучшей растворимости RsfS был экспрессирован и выделен совместно со своим белком-партнером L14. Структуры белков были подробно проанализированы, что позволило установить аминокислоты, участвующие в формировании связи в гетеродимере. Для замены установленных аминокислот был произведен сайт-направленный мутагенез, включающий в себя разработку праймеров и ПЦР. Последовательность мутантных генов была секвенирована для подтверждения наличия мутаций. Для выделения и очистки белкового комплекса L14-his/RsfS провели трансформацию мутантных плазмид в штамм *E. coli* BL21 (DE3) pLys. Клетки выращивали на питательной среде, затем индуцировали экспрессию с помощью ИПТГ, после чего клетки собирали и лизировали. Из полученного лизата выделяли комплекс L14-his/RsfS методом афинной хроматографии. Поскольку в гетеродимере только белок L14 содержит гистидиновый таг, выделение второго белка RsfS зависит от эффективности формирования димера. Таким образом анализ выделенных белков с помощью денситометрии позволяет судить об изменении прочности связи между белками L14-his/RsfS с аминокислотными заменами. Результаты очистки белков показаны на Рисунке 1. Отношение количеств RsfS к L14 показано в Таблице 2. Относительное увеличение белка L14-his говорит об ослаблении связи белков в гетеродимере, что приводит к менее эффективному выделению второго белка – RsfS.

Таблица 2. Отношение количества выделенных мутантных белков.

Мутация	R97A	R107A	K113A	L117E	D81A	E70A	Y98A	W77E	WT
Соотношение L14-his/RsfS	4,489	6,793	4,447	4,702	2,82*	9,118	8,195	4,099	3,824

\* выделены в недостаточном количестве

**Заключение.** Таким образом, можно утверждать, что мутации E70A Y98A, R107A, L117E, R97A, K113A, W77E (в порядке убывания) действительно оказывают негативное влияние на прочность связи белков в гетеродимере L14/RsfS, при этом замены заряженных аминокислот Glu<sup>70</sup>, Arg<sup>97</sup> и ароматической Tyr<sup>98</sup> являются наиболее критичными для димеризации.

#### Список литературы

1. X. Li, Q.Sun, , C. Jiang, K.Yang, L.W. Hung, J. Zhang, J.C. Sacchettini, Structure of Ribosomal Silencing Factor Bound to *Mycobacterium tuberculosis* Ribosome. Structure. 2015; **23**: 2387-2405.
2. T. Prossliner, K. Skovbo Winther, M.A. Sorensen, K. Gerdes Ribosome Hibernation. Annu Rev Genet 2018; **52**: 321-348.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛАКТОБАЦИЛЛ

*Волкова А.С., Арзамасцева А.А., Анисимова Е. А., Яруллина Д.Р.*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

[volkov-alisa@yandex.ru](mailto:volkov-alisa@yandex.ru), 89655842512

**Введение.** Бактерии рода *Lactobacillus* являются важной составляющей естественной микробиоты кишечника человека, а также широко применяются в пищевой промышленности и в качестве пробиотиков, используемых в терапии дисбактериозов [Джобулаева с соавт., 2014]. Лактобациллы оказывают благотворное действие на организм благодаря антагонистической активности в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий, иммуномодулирующему действию, противоопухолевому и антиаллергенному эффектам и многим другим механизмам [Каблова с соавт., 2015]. Большое практическое и медицинское значение лактобацилл определяет необходимость их быстрой и однозначной видовой идентификации. Сложность таксономической идентификации внутри данного рода обусловлена многочисленным видовым составом, а также сходными фенотипическими и физиологическими характеристиками у многих видов. Традиционно для идентификации микроорганизмов используют фенотипические методы, которые основаны на анализе морфологических, физиолого-биохимических и тинкториальных свойств. Однако результаты этих тестов часто трудно интерпретировать, они противоречивы и требуют последующего подтверждения. Современные молекулярно-генетические методы, в частности, анализ последовательности нуклеотидов гена 16S рНК, зарекомендовали себя как наиболее надежные, но они являются относительно дорогими, трудоемкими и затратными по времени, поэтому не подходят для массового использования [Cherkaoui *et al.*, 2010]. В последнее время для идентификации микроорганизмов используют MALDI-TOF масс-спектрометрию, основанную на идентификации масс-спектрометрического профиля рибосомных белков, полученного по технологии матрица-активированной лазерной десорбции/ионизации протеинов. К преимуществам MALDI-TOF масс-спектрометрии относятся высокая чувствительность, несложная пробоподготовка, быстрота проведения анализа и более низкая по сравнению с молекулярными методами стоимость реактивов и материалов, используемых при идентификации [Pavlovic *et al.*, 2013].

Целью данной работы является сравнительный анализ методов таксономической идентификации бактерий рода *Lactobacillus*.

**Материалы и методы.** В данной работе использовали 15 штаммов лактобацилл выделенные нами ранее из природных эконисш, кисломолочных продуктов и пробиотиков, и 5 коллекционных штаммов. Предварительно все исследуемые бактерии были отнесены к роду *Lactobacillus* согласно ГОСТ 10444.11-89 по положительному окрашиванию по Граму, отсутствию спорообразования и каталазной активности. Видовую идентификацию выделенных бактерий проводили с помощью прямого белкового профилирования MALDI-TOF масс-спектрометрии (Bruker, Германия) и на основе анализа последовательности гена 16S рНК. Гены 16S рНК амплифицировали методом ПЦР с применением пары праймеров 27f и 1392g и секвенировали методом Сэнгера на секвенаторе ABI Prism 3730 (Applied

Biosystems). При фенотипической идентификации лактобацилл спектр утилизируемых сахаров определяли с помощью коммерческих тест-систем «АНАЭРОтест-23» и «СТРЕПТОтест-24» («MicroLaTest», Чехия).

**Результаты и обсуждение.** Исследуемые лактобациллы отнесены к видам *L. fermentum* (9 штаммов) и *L. plantarum* (6 штаммов), а для референсных штаммов *L. fermentum* 90 ТС-4, *L. brevis* DSM 20054, *L. brevis* ssp. *gravesensis* LMG 7934, *L. buchneri* DSM 20057, *L. rhamnosus* В-8238 подтверждена видовая принадлежность. Результаты видовой идентификации лактобацилл с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии и по последовательности гена 16S рРНК совпали для 19 из 20 штаммов. По последовательности гена 16S рРНК и по спектру утилизируемых сахаров штамм *Lactobacillus sp.* HF-B1 отнесен к виду *L. plantarum*, в то время как методом MALDI-TOF масс-спектрометрии он был идентифицирован как *L. fermentum*. Также нами показаны ограничения анализа спектра утилизируемых субстратов в видовой идентификации лактобацилл: ферментационный профиль не позволил дифференцировать виды *L. brevis/L. buchneri/L. hilgardii*, следовательно, данный подход не пригоден для однозначной видовой идентификации лактобацилл.

**Заключение.** Данные MALDI-TOF масс-спектрометрии и анализа последовательности гена 16S рРНК коррелируют между собой, что подтверждает высокие возможности MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации лактобацилл. В случае, когда данные масс-спектрометрии и анализа рРНК противоречат друг другу, как вспомогательный метод возможно использовать метод построения «пестрого ряда». Таким образом, было показано, что решение проблем и вопросов внутриродовой идентификации лактобацилл остается актуальной задачей современной микробиологии, решение которой лежит в комбинировании известных молекулярно-генетических, фенотипических и современных методов, таких как MALDI-TOF.

#### Список литературы

- 1) А. К. Джобулаева, А. К. Саданов, С. А. Айткельдиева, Б. Т. Байкара, Г. Т. Джакибаева, К. М. Кебекбаева. Молекулярно-генетическая идентификация двух штаммов молочнокислых бактерий на основе анализа нуклеотидных последовательностей 16S rRNA гена. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014; 8; 63-67.
- 2) М. А. Каблова, Р. А. Шурхно, А. С. Сироткин. Молочнокислые бактерии в сельскохозяйственном производстве. Вестник технологического университета. 2015; 18; 145-149.
- 3) A. Cherkaoui, J. Hibbs, S. Emonet, M. Tangomo, M. Girard, P. Francois, J. Schrenzel. Comparison of two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of *Bacteria* to the species level. 2010; 48; 1169-1175
- 4) M. Pavlovic, I. Huber, R. Konrad, U. Busch. Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria. 2013; 7; 135-141

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-34-00268 в рамках Программы повышения конкурентоспособности КФУ с использованием оборудования Междисциплинарного центра коллективного пользования КФУ

# НОВЫЙ ФЕРМЕНТ СУР74 ТАБАКА ОБЫКНОВЕННОГО (*NICOTIANA TABACUM*): ОБНАРУЖЕНИЕ, КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА И ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА

*М.Е. Воробьева, Е.О. Смирнова, С.С. Горина, Е.К. Аскарлова, Я.Ю. Топоркова,  
А.Н. Гречкин*

## **Воробьева Мария Егоровна**

бакалавр четвертого года обучения, Казанский федеральный университет, РФ, г. Казань

## **Смирнова Елена Олеговна**

младший научный сотрудник, КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, РФ, г. Казань

## **Горина Светлана Сергеевна**

научный сотрудник, КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, РФ, г. Казань

## **Аскарлова Елена**

младший научный сотрудник, КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, РФ, г. Казань

## **Топоркова Яна Юрьевна**

старший научный сотрудник, КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, РФ, г. Казань

## **Гречкин Александр Николаевич**

доктор химических наук, академик РАН, КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, РФ, г. Казань

[mari.vorobeva.1998@mail.ru](mailto:mari.vorobeva.1998@mail.ru)

**Введение.** Ферменты семейства СУР74 играют важную роль в биосинтезе сигнальных молекул – оксипиринов. Данные молекулы участвуют в жизненно необходимых процессах организма, таких как рост и развитие, а также формирование ответных реакций организма на сигналы внешней среды [1]. Семейство СУР74 включает нетипичных представителей цитохромов P450, функционирующих в отсутствие любой системы переноса электронов и не нуждающихся в молекулярном кислороде, то есть не являющихся монооксигеназами. Вместо этого ферменты СУР74 катализируют превращение уже насыщенных кислородом гидроперекисей полиненасыщенных С18 жирных кислот [2]. В семейство СУР74 входят алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ), эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС) и дивинилэфирсинтазы (ДЭС) [2]. Ключевой точкой переключения механизма катализа данных ферментов является эпоксиаллильный радикал, который затем претерпевает изменения в зависимости от типа фермента (рисунок 1) [3].

В качестве субстратов ферменты СУР74 используют гидроперекиси ленолевой и  $\alpha$ -леноленовой кислот и не используют кислород, поэтому у ферментов СУР74 кислород-связывающий домен заменен на гидропероксид-связывающий домен (ГСД). Данный домен является важным для каталитического действия ферментов СУР74. Последовательность домена ГСД зависит от типа фермента [3]. Помимо ГСД для каталитического действия ферментов СУР74 важным является так называемый F/L toggle, расположенный в субстрат-распознающем сайте СРС-1. Было показано, что замены в домене ГСД и F/L toggle приводят к смене типа каталитической активности ферментов СУР74 [3], [4].

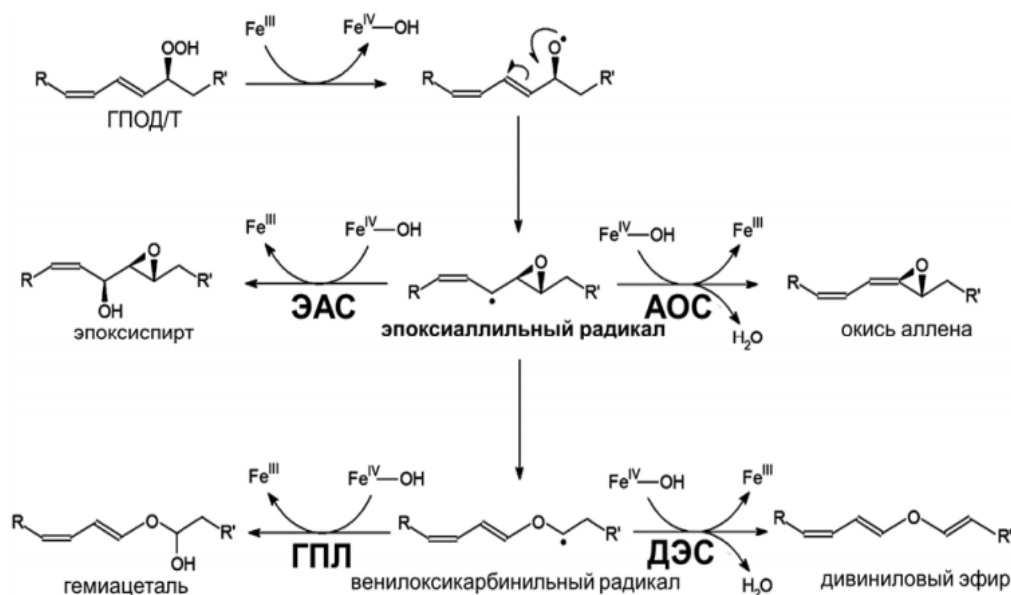


Рисунок 1 - Схема каталитических механизмов ферментов CYP74 [3].

Кроме того, было показано, что некоторые ферменты CYP74 являются дуалистичными. Так, например, некоторые ранее считавшиеся ГПЛ подсемейства CYP74C обладают дополнительной ЭАС активностью. Помимо этого, в продуктах реакции АОС томата (CYP74C3) с 9-гидроперекисью были обнаружены в небольшом количестве продукты ГПЛ реакции [4]. Кроме того, недавно было показано, что ДЭС льна (CYP74B16, LuDES), лютика едкого (CYP74Q1, RaDES) и табака (CYP74D3, NtDES) также являются дуалистичными [5].

В результате транскриптомного анализа было показано, что при инфицировании растений табака *Nicotiana tabacum* фитопатогеном *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 повышается уровень экспрессии трех генов, предположительно кодирующих ГПЛ, исходя из особенностей аминокислотных последовательностей каталитически важных доменов.

В связи с вышесказанным, было проведено клонирование гена, предположительно кодирующего гидропероксидазу NtHPL табака обыкновенного (*Nicotiana tabacum*) и получение соответствующего рекомбинантного фермента.

**Материалы и методы.** Было выполнено клонирование гена табака XP\_53532 с использованием вектора pET-32 Ek/LIC методом безлигазного клонирования (Novagen, USA) и экспрессирующего штамма *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Процедура получения и очистки целевого белка была разработана нами на основе нескольких общепринятых протоколов [3],[4].

**Результаты.** Был получен рекомбинантный фермент табака XP\_53532, наработку которого в клетках оценивали по результатам электрофоретического разделения тотальных белков лизата в полиакриламидном геле. Размеры белка определяли по сравнению с маркером молекулярного веса SDS-PAGE Standarts Low Range (Bio-Rad, США). Размер полученного белка составил 70 кДа. Предпочтительными субстратами рекомбинантного фермента являются 9-гидроперекиси жирных кислот. Инкубация фермента с 9-ГПОТ приводила к образованию 9-оксононановой кислоты – продукта ГПЛ. В то же время, в реакции с 9-ГПОД помимо 9-оксононановой кислоты синтезировались эпоксиспирты и тригидроксикислоты – продукты ЭАС. С 13-ГПОД фермент также проявлял ГПЛ/ЭАС активность. В отношении 13-ГПОТ исследуемый фермент не проявлял активности. Таким образом, исследуемый фермент является дуалистичным.

**Обсуждение.** Известно, что продукты ГПЛ синтезируются в ответ на механическое воздействие на растения. При этом ГПЛ ответ является самым быстрым. Исследуемый фермент является гидропероксидазой с дополнительной ЭАС активностью и это не единственный фермент такого типа. Ранее подобные свойства были описаны для ферментов семейства CYP74C. Можно сделать предположение о том, что сочетание разных типов активности у некоторых ферментов CYP74 помогают растению в борьбе с фитопатогенами. Однако чтобы подтвердить данную гипотезу, следует провести дополнительные исследования функций эпокси спиртов - продуктов ЭАС. Ранее для данных метаболитов был описан фунгицидный эффект [4].

#### **Заключение.**

Было установлено, что рекомбинантный фермент табака XP\_53532 утилизирует преимущественно 9-гидроперекиси жирных кислот. Кроме того, было показано, что данный фермент является дуалистичным и обладает ГПЛ/ЭАС активностью.

#### *Список литературы*

1. Т.В. Савченко. Оксипирины и устойчивость растений к абиотическим стрессам. Биохимия. 2014; 79: 458-475.
2. A.R. Brash. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes. Phytochemistry. 2009; 70: 1522-1531.
3. Y.Y. Toporkova, E.V. Osipova, L.S. Mukhtarova, Y.V. Gogolev, A.N. Grechkin. Alteration of catalysis of CYP74C subfamily enzymes as a result of site – directed mutagenesis. Dokl. Biochem. Biophys. 2010; 435: 287-290.
4. Y.Y. Toporkova, S.S. Gorina, E.K. Bessolitsyna, E.O. Smirnova, V.S. Fatykhova, F. Brühlmann, T.M. Ilyina, L.S. Mukhtarova, A.N. Grechkin. Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis. Biochim. Biophys. Acta. 2018; 1863: 369-378.
5. Е.О. Смирнова, Е.К. Аскарова, С.С. Горина, Т.М. Ильина, Л.Ш. Мухтарова, Я.Ю. Топоркова, А.Н. Гречкин. Специфичность действия дивинилэфирсинтаз из разных подсемейств семейства CYP74. ActaNaturae. 2019; 2: 269.

*Исследование дуалистичных ферментов поддержаны грантом МК-5989.2019.4. Исследование фермента CYP74B16 поддержано грантом РФФИ 18-34-01012мол\_а. Работы по изучению фермента NtHPL проводились при финансовой поддержке государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.*

## ДИЗАЙН ТВЁРДЫХ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ, НАГРУЖЕННЫХ ФЛУОРЕСЦЕИНОМ, НА ОСНОВЕ МОНОЗАМЕЩЕННЫХ ПИЛЛАР[5]АРЕНОВ

*Гуральник Е.Г., Якимова Л.С., Шуртик Д.Н., Стойков И.И.*

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет», Химический институт им. А.М. Бутлерова, 420008 Казань, ул. Кремлёвская 18

[guralnik1997@mail.ru](mailto:guralnik1997@mail.ru), +79376276354

**Введение.** Создание систем целенаправленной доставки визуализирующих агентов является перспективной и многообещающей областью исследования. Решение проблемы адресной доставки достигается за счет использования различных липидных наноносителей. Современные подходы супрамолекулярной химии позволяют создавать аналогичные липидные системы на основе модифицируемых макроциклических платформ. Среди последних особый интерес вызывают открытые в 2008 году научно-исследовательской группой Томоки Огоши пиллар[*n*]арены, представляющие собой 1,4-дизамещенные парациклофаны. Рассматриваемый класс макроциклов обладает рядом уникальных свойств, наиболее привлекательным из которых является способность к супрамолекулярной самосборке с образованием различных самоассоциатов, что обуславливает перспективу их использования в качестве молекул-хозяев для создания новых селективных супрамолекулярных рецепторных систем. В связи с этим цель данной работы заключалась в синтезе и выявлении закономерностей супрамолекулярной самосборки монозамещенных пиллар[5]аренов и изучении комплексообразующих свойств получаемых самоассоциатов по отношению к модельному биополимеру.

**Материалы и методы.** При проведении исследования использовались следующие физические методы: спектроскопия ЯМР, ИК-спектроскопия, МАЛДИ масс-спектрометрия, элементный анализ, УФ-спектроскопия, динамическое рассеяние света, просвечивающая электронная микроскопия, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. В работе применялись следующие реагенты: вода дистиллированная, трихлорметан (х.ч.), параформальдегид (х.ч.), трифторуксусная кислота (х.ч.), 1,2-дихлорэтан (х.ч.), 1,4 – диметоксибензол (х.ч.), трибромид бора (х.ч.), этиловый спирт (х.ч.), пятиокись фосфора (х.ч.), ацетонитрил (х.ч.), этилбромацетат (х.ч.), карбонат калия (х.ч.), толуол (х.ч.), диэтилентриамин (х.ч.), дипропилентриамин (х.ч.), N-(2-гидроксиэтил)этилендиамин (х.ч.), 3-морфолинпропиламин (х.ч.), аммиак водный (х.ч.), тетрагидрофуран (х.ч.), флуоресцеин (х.ч.), ДНК тимус теленка (Sigma).

### **Результаты.**

1. Синтезированы новые монозамещенные пиллар[5]арены, содержащие амидные, гидроксильные и аминокгруппы, морфолиновый фрагмент. Структуры полученных соединений подтверждены рядом физических методов (ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , ИК спектроскопией, масс-спектрометрией).
2. В ряду синтезированных монозамещенных пиллар[5]аренов установлено влияние структуры заместителя и природы растворителя на их самоассоциацию и агрегационные свойства.



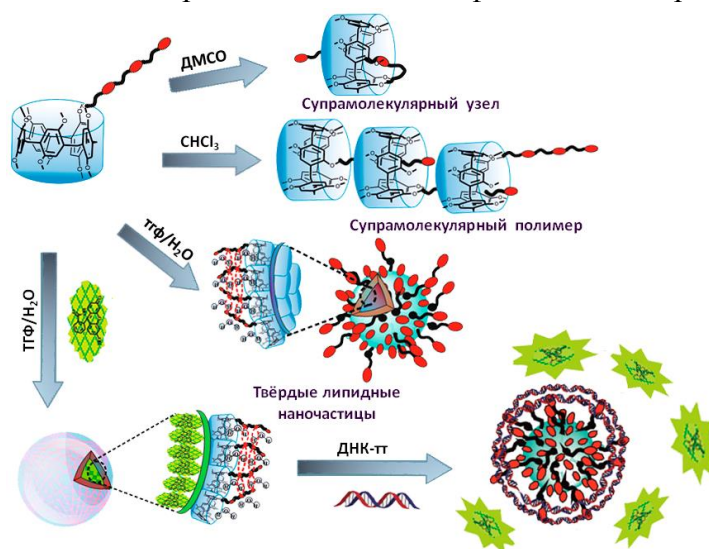
3. Методами УФ и ЯМР спектроскопии проведена оценка комплексообразующих свойств синтезированных монозамещенных пиллар[5]аренов по отношению к флуоресцентному красителю.

4. Предложены и реализованы методики синтеза твердых липидных наночастиц из монозамещенных пиллар[5]аренов. Показано, что введение красителя в твердые липидные наночастицы в процессе синтеза понижает размер формирующихся частиц и повышает их стабильность, что характеризуется увеличением значения электрокинетического потенциала системы.

5. Выявлено, что синтезированные твердые липидные наночастицы с флуоресцентным красителем проявляют флуоресценцию только при взаимодействии с модельными ДНК, что открывает возможность их применения в качестве флуоресцентных меток.

**Обсуждение.** На первом этапе работы был проведен синтез целевых амфифильных монозамещенных пиллар[5]аренов. Структуры полученных соединений были подтверждены комплексом физических методов. Синтезированные производные были исследованы на способность к формированию самоассоциатов в различных растворителях. Методом  $^1\text{H}$  спектроскопии ЯМР было установлено влияние заместителей на природу образующихся супрамолекулярных систем: наличие в заместителе фрагментов, содержащих терминальные аминокислотные группы, приводит в протондонорной хлороформе к образованию супрамолекулярных полимеров и способствует формированию в протонакцепторной диметилсульфоксиде псевдоротацановых структур; замена концевой аминокислотной группы на гидроксильную или циклический морфолиновый фрагмент, а также удлинение алкильного линкера влияют на форму и размер образующихся агрегатов. Способность к самоорганизации синтезированных амфифильных пиллар[5]аренов может быть использована для создания более сложных коллоидных систем. Нами были получены твердые липидные наночастицы (ТЛН) в воде методом нанопреципитации с использованием системы растворителей ТГФ-вода. Сформированные наночастицы были охарактеризованы методами просвечивающей электронной микроскопии и динамического рассеяния света. Полученные параметры отдельных наночастиц сохранялись неизменными в течение более трех месяцев, что говорит о высокой стабильности полученных частиц и обуславливает перспективу их использования по сравнению с везикулами на основе пиллар[5]аренов, стабильность которых не превышает недели. Сформированные ТЛН на основе синтезированных макроциклов могут выступать в качестве новых наноразмерных носителей для таргетной доставки фармацевтических агентов. Нами было проведено исследование комплексообразующих свойств пиллар[5]аренов и ТЛН на их основе с одним из наиболее используемых в биологии и медицине красителей - флуоресцеином. Добавление раствора красителя к растворам сформированных ТЛН не вызывало изменений в спектрах поглощения, а также способствовало образованию дендритных структур при добавлении флуоресцеина к ТЛН с гидродинамическим диаметром большим по сравнению с исходными ТЛН без красителя, при этом стабильность системы значительно понизилась, что говорит о невозможности использования получаемых ТЛН в качестве систем доставки. В связи с чем нами было предложено осуществить синтез ТЛН, нагруженных красителями, вводя флуоресцентную метку непосредственно в ходе синтеза наночастиц. Методом нанопреципитации, используемым ранее, с одновременным введением красителя нами были синтезированы ТЛН, нагруженные флуоресцеином. Проанализировав данные анализа морфологии полученных частиц, можно сделать вывод о том, что введение красителей в ТЛН способствует получению частиц меньшего размера и большей стабильности.

Объяснением данного изменения может служить образование контактной ионной пары макроцикл-краситель на первом этапе синтеза и дальнейшая переорганизация структуры при формировании ТЛН, характеризующаяся выбиванием заместителя из полости макроцикла на поверхность ассоциата, что способствует большей стабильности наночастиц, что было подтверждено методами спектроскопии ЯМР. Завершающий этап работы заключался в изучении супрамолекулярной самосборки полученных ТЛН, содержащих флуоресцентный маркер, с биополимером – модельной ДНК из тимуса телят. Нами были зарегистрированы спектры электронного поглощения для растворов полученных наночастиц, ДНК и смесей и впоследствии охарактеризованы методом ДРС. Самосборка частиц с флуоресцеином и ДНК характеризовалась появлением батохромного сдвига и гиперхромного эффекта в спектрах поглощения, а также сопровождалось люминесценцией, усиленной ультрафиолетовым облучением, что может свидетельствовать о высвобождении молекул красителя в момент взаимодействия, что было подтверждено методом конфокальной микроскопии.



**Заключение.** Таким образом, в ходе данной работы были синтезированы монозамещенные производные пиллар[5]арена, содержащие амидные, гидроксильные и амидные фрагменты, проявляющие способность к образованию различных супрамолекулярных систем в зависимости от условий – супрамолекулярных полимеров в протондонорных растворителях и псевдоротаКСановых структур в протонакцепторных. На основе синтезированных макроциклов впервые получены твердые липидные наночастицы, стабильные в воде в течение длительного промежутка времени. Возможность образования комплексов между пиллар[5]аренами и красителями позволила сформировать на их основе твердые липидные наночастицы, содержащие флуоресцентную метку, способные к высвобождению визуализирующего агента при взаимодействии с биополимером. Полученные результаты говорят о перспективе применения данных макроциклов и наноносителей на их основе для решения актуальной задачи доставки терапевтических и визуализационных агентов.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ №17-13-01208.*

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА СКВАШИВАНИЯ МОЛОКА ПРОБИОТИЧЕСКОЙ ПОЛИКОМПОНЕНТНОЙ ЗАКВАСКОЙ

*Загретдинова А.И., Нигъмбетзянова Г.Г., Габдукаева Л.З.*

*Загретдинова А.И., Нигъмбетзянова Г.Г. – магистранты кафедры технологии пищевых производств, Габдукаева Л.З. – к.т.н., доц. каф. ТПП ФГБОУ ВО КНИТУ*

[carramba@bk.ru](mailto:carramba@bk.ru), 89274061725

**Введение.** В настоящее время российский рынок сыра является одним из наиболее перспективных сегментов на рынке продуктов питания. Пищевая ценность сыров обусловлена содержанием в них молочных белков и жира, наличием незаменимых аминокислот, витаминов, летучих и высокомолекулярных жирных кислот, кальциевых, фосфорнокислых и других минеральных солей.

Мягкие сыры характеризуются высоким содержанием полноценных белков (до 18-25 %) и азотистых соединений, значительная часть которых находится в растворимой форме, хорошо усваиваемой и перевариваемой организмом человека, а также минеральных веществ, участвующих в костеобразовании и строении тканей [1].

Сыры широко используются в питании людей всех возрастных групп, особенно детей, подростков и людей пожилого возраста. Преимуществом производства творожных сыров является то, что на их основе можно выработать различные кулинарные изделия, десерты лечебно-профилактического характера.

Необходимым элементом биотехнологии сыров являются бактериальные закваски. Установлено, что комплексные закваски на основе консорциумов микроорганизмов, обладают более высокой активностью по сравнению с заквасками, приготовленными с использованием чистых культур. Объясняется это тем, что между микроорганизмами многовидовой закваски происходит обмен продуктами жизнедеятельности и, в связи с этим, значительно повышаются и усиливаются их биотехнологические свойства [2].

Использование микроорганизмов - представителей естественной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека является предпочтительным, так как именно этим бактериям принадлежит ведущая роль в нормализации микробиоценоза кишечника, белкового и минерального обмена [3].

Микроорганизмы, входящие в состав заквасочной микрофлоры, определяют интенсивность и направленность изменений, происходящих в молоке и сырной массе, в технологии выработки сыров, физико-химические, органолептические, диетические, лечебно-профилактические свойства готовой продукции.

Заквасочная микрофлора обуславливает вкусовые и ароматические свойства сыра, его консистенцию, питательную и биологическую ценность, влияет на активность ферментов и синерезис при образовании сгустка, подавляет развитие нежелательной микрофлоры [4].

**Материалы и методы.** Экспериментальные исследования проводили в лабораториях кафедры технологии пищевых производств.

Объектами исследования для производства мягкого сыра явились: молоко коровье питьевое пастеризованное с массовой долей жира 2,5 %; молоко коровье цельное отборное питьевое пастеризованное с массовой долей жира 3,5 %; молоко козье с массовой долей жира от 6 до 9 %; сливки стерилизованные с массовой долей жира 20 % ; кальций хлористый 77 %;

комплекс сухих микроорганизмов пробиотиков «Эвиталия», производимый фирмой ООО «НПФ «ПРОБИОТИКА».

Применение в качестве закваски комплекса сухих микроорганизмов пробиотиков «Эвиталия» обусловлено целью получения продукта, обладающего диетическими и лечебно-профилактическими свойствами.

Закваска представляет собой лиофильно высушенный консорциум микроорганизмов, состоящий из пяти штаммов (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Propioni-bacterium freudenreichi subsp. shermanii*), используемый для производства кисломолочных продуктов.

Закваска является биологически активной добавкой к пище, позволяет восстановить кишечную флору, функциональные нарушения работы желудочно-кишечного тракта при различных заболеваниях.

**Результаты.** С целью изучения влияния закваски на интенсивность процесса сквашивания молока определили титруемую кислотность в процессе сквашивания и характер сгустка на конец процесса.

Сквашивание молока с внесением закваски осуществляли в термостате в течение 12 ч при температуре 40 °С.

В процессе сквашивания образцов молочной смеси наблюдали изменения показателя титруемой кислотности и качественных характеристик сгустка в зависимости от продолжительности сквашивания, которые представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 - Изменение показателя титруемой кислотности сгустка в процессе сквашивания

Время сквашивания, ч	Кислотность, °Т		
	Смесь коровьего молока (2,5 %) и сливок	Смесь коровьего молока (3,5%) и сливок	Козье молоко (6-9 %)
Начальная кислотность молока	18	19	22
9	23	27	33
10	41	46	51
11	51	60	54
12	55	64	54

Таблица 2 - Качественные характеристики сгустка молока в зависимости от вида, жирности молока и продолжительности сквашивания

Время сквашивания, ч	Характеристика сгустка		
	Смесь коровьего молока (2,5 %) и сливок	Смесь коровьего молока (3,5%) и сливок	Козье молоко (6-9 %)
9	Жидкий, хлопьевидный	Плотный, сметанообразный	Жидкий, хлопьевидный
10	Жидкий, средний по густоте, хлопьевидный	Плотный, густой, сметанообразный	Жидкий, сметанообразный
11	Плотные, крупные хлопья	Плотный, густой, йогуртообразный	Жидкий, сметанообразный
12	Плотные, крупные хлопья	Плотный, густой, йогуртообразный	Жидкий, сметанообразный

**Обсуждение.** На начальном этапе во всех образцах наблюдалось увеличение титруемой кислотности, а затем ее достижение до постоянного значения. Возможно, это связано с ростом и накоплением молочнокислых бактерий в молоке в начале процесса сквашивания. Известно, что при внесении закваски в молоко на первой фазе развития микроорганизмов (лаг-фаза) наблюдается их адаптация, приспособление к условиям и составу среды. Логарифмическая фаза характеризуется максимальной скоростью клеточного деления. **В фазе стационарного роста** количество жизнеспособных клеток остается без изменений, составляя максимальный уровень, что приводит к постоянству значений кислотности, что мы и наблюдали. На четвертой фазе (фаза отмирания) происходит замедление роста микроорганизмов и снижение процесса кислотонакопления.

Необходимо отметить высокие значения кислотности образца из козьего молока впервые 9 часов сквашивания, что может быть связано с повышенной начальной кислотностью сыря. К концу процесса сквашивания высокое значение кислотности установлено у смеси из коровьего молока с массовой долей жира 3,5 %. Причиной тому могла послужить высокое значение жирности по сравнению с другими образцами.

На конец процесса сквашивания (12 ч) из исследуемых образцов образовался сгусток с определенными характеристиками (таблица 2). Из смеси коровьего молока более высокой жирности образовался плотный, густой сгусток, из смеси коровьего молока низкой жирности - менее плотный, из козьего молока - жидкий, сметанообразный сгусток при достижении показателя кислотности 54 °Т.

Возможно, на характер образования сгустка и его консистенцию повлияло несколько факторов: вид молока и его химический состав, кислотность и жирность молочной смеси, а также состав используемой закваски.

**Заключение.** Таким образом, можно сделать вывод о возможности применения исследуемой закваски для интенсификации процессов кислотообразования и сквашивания коровьего молока, а также для получения кисломолочных продуктов и мягких сыров с пробиотическими свойствами.

#### *Список литературы*

1. L.G. Goroshenko. The development trend of the Russian dairy market. Dairy industry. 2009, N 3, pp. 12-16.
2. S. I. Artiukhova, T.T. Tolstoguzova. Biotechnology bioproducts «Healing-1». Vestnik VGUIT. 2014, vol. 4, pp. 183-186.
3. A.M. Nikolaev. Technology of soft cheeses, Food Industry, 1980. p. 210.
4. V.F. Semenikhina, I.V. Rozhkova, T.A. Rashoshnaya., A.A. Abramova. Development of starter cultures for dairy products. Dairy industry. 2013, N 11, pp. 30-31.

## ВЛИЯНИЕ МАГНЕТИТА НА АНАЭРОБНУЮ КОНВЕРСИЮ ПОСЛЕСПИРТОВОЙ БАРДЫ

*Зиганшина Эльвира Эмилевна, Белостоцкий Дмитрий Евгеньевич, Зиганшин Айрат Мансурович*

Казанский федеральный университет

[ayrat.ziganshin@kpfu.ru](mailto:ayrat.ziganshin@kpfu.ru)

В последние десятилетия исследования в области анаэробного процесса переработки различной биомассы с попутным синтезом биометана стремительно набирают обороты, при этом особое внимание уделяется проблеме повышения эффективности функционирования анаэробных систем. Биотехнологии получения возобновляемой энергии из органических отходов сельского хозяйства позволяют не только экономить энергоресурсы и решать проблему утилизации больших масс органических отходов, но и сократить выбросы парниковых газов [1-3].

Биометан продуцируется разнообразными анаэробными микробными сообществами, и взаимоотношения между представителями данных сообществ напрямую влияют на эффективность анаэробного процесса. Среди стратегий повышения эффективности анаэробной утилизации органических загрязнителей отмечают технологии с внесением определенных материалов для ускорения конверсии биомассы в биогаз. Так, в небольшом ряде работ отмечено, что внесение минерала магнетита ( $Fe_3O_4$ ) способствует уменьшению накопления короткоцепочечных жирных кислот и ускоренному синтезу биометана в процессе конверсии субстратов с высоким содержанием сухих веществ [4, 5].

В настоящем исследовании для выявления эффекта влияния магнетита на эффективность микробной конверсии биомассы был поставлен ряд экспериментов анаэробной конверсии отхода эксплуатации спиртовых заводов, сухой гранулированной барды (distillers dried grain with solubles, DDGS), с внесением наночастиц магнетита различной концентрации (0.8-6.0 г/л трансформируемого субстрата).

Эффективность анаэробной конверсии DDGS оценивали по деградации органического вещества с образованием биометана с помощью автоматической системы тестирования потенциала метана AMPTS II Light (Bioprocess control) в двухлитровых реакторах (с рабочим объемом 1.6 л). В качестве инокулята для инициации анаэробного процесса вносили смесь трансформированного корьевого навоза и соломы из лабораторных мезофильных реакторов. Испытания проводили в трех повторах. Образцы из всех реакторов отбирали для исследований, включавших анализ твердых веществ, органического вещества, pH, содержания органических кислот, общего аммиачного азота, свободного аммиачного азота и структуры микробных сообществ. Газ периодически отбирали и анализировали на содержание метана и диоксид углерода с помощью газового хроматографа.

Показано, что внесение магнетита концентрацией 4 г/л субстрата ускорило выработку биометана в большей степени. В данном случае суммарный выход биометана составил более 11.1 л против 10.5 л в контрольных экспериментах (из 40 г DDGS). Результаты анализа летучих жирных кислот указали на активное вовлечение кислот в метаногенез. Полученные результаты указывают на возможность эффективной конверсии отходов спиртового производства в биометан с дополнительным внесением магнетита.

### Список литературы

1. M. Westerholm, J. Moestedt, A. Schnürer. Biogas production through syntrophic acetate oxidation and deliberate operating strategies for improved digester performance. *Applied Energy*. 2016; 179: 124-135.
2. A.F. Salvador, G. Martins, M. Melle-Franco, R. Serpa, A.J. Stams, A.J. Cavaleiro, M.A. Pereira, M.M. Alves. Carbon nanotubes accelerate methane production in pure cultures of methanogens and in a syntrophic coculture. *Environmental Microbiology*. 2017; 19: 2727-2739.
3. E.E. Ziganshina, E.M. Ibragimov, P.Y. Vankov, V.A. Miluykov, A.M. Ziganshin. Comparison of anaerobic digestion strategies of nitrogen-rich substrates: Performance of anaerobic reactors and microbial community diversity. *Waste Management*. 2017; 59, 160-171.
4. Y. Wang, G. Ren, T. Zhang, S. Zou, C. Mao, X. Wang. Effect of magnetite powder on anaerobic co-digestion of pig manure and wheat straw. *Waste Management*. 2017; 66: 46-52.
5. T. Wang, D. Zhang, L. Dai, B. Dong, X. Dai. Magnetite triggering enhanced direct interspecies electron transfer: a scavenger for the blockage of electron transfer in anaerobic digestion of high-solids sewage sludge. *Environmental Science & Technology*. 2018; 52: 7160-7169.

Работа выполнена при финансовой поддержке «Российского фонда фундаментальных исследований» в рамках научного проекта № 18-29-25058.

## ДРОЖЖЕВАЯ СИСТЕМА ЭКСПРЕССИИ НА ОСНОВЕ ГЕНА БЕТА-ПРОПЕЛЛЕРНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ФИТАЗЫ И СИГНАЛЬНОГО ПЕПТИДА $\alpha$ -MATING FACTOR

Иткина Д.Л., Сулейманова А.Д., Шарипова М.Р.

Институт фундаментальной медицины и биологии, К(П)ФУ, Казань, Россия  
[laia9301@mail.ru](mailto:laia9301@mail.ru), 8(950)-313-39-63

Одним из качественных направлений решения проблемы дефицита фосфора в питании животных является внесение в корм экзогенного фермента микроорганизмов — фитазы, которая осуществляет гидролиз фитата и высвобождает фосфор, который затем легко усваивается в пищеварительном тракте. Высоко-экспрессионная система на основе дрожжей *Pichia pastoris* широко используется в биоинженерии для получения рекомбинантных белков в исследовательских и прикладных целях. Цель работы – получение дрожжевых систем экспрессии на основе гена бациллярной фитазы.

Для экспрессии в дрожжевых клетках *P. pastoris* использовали последовательность оптимизированного гена бета- пропеллерной фитазы *Bacillus ginsengihumi* M2.11 – phyC, к структурным областям которых добавляли С-терминальный His-таг, и клонировали в вектор pUC57 (Genscript, США). Использовали интегративные дрожжевые вектора pPINK-НС и pPINK-LC и нуклеотидную последовательность высокоэффективного сигнального пептида  $\alpha$  mating factor. Проводили трехступечатое лигирование вектора (pPINK-НС/ pPINK-LC), последовательности сигнального пептида и гена фитазы (phyC), с последующей трансформацией лигазной смеси в клетки *E.coli* DH5 $\alpha$ . Отбор трансформантов проводили на среде с ампициллином (100 мкг/мл). Были получены рекомбинантные штаммы *P. pastoris* под контролем индуцибельного дрожжевого промотора гена AOX1, обеспечивающий

активацию транскрипции в присутствии метанола в среде, а также область инициации транскрипции.

Дальнейшее выделение и очистка, изучение экспрессии и свойств фермента станет одним из этапов в решении проблем, связанных с регулированием фосфорного обмена и будет способствовать развитию биотехнологического производства фитаз.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-31-27001.

## **ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ ОБРАБОТКИ НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ТЕСТОВЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ**

*Китаевская С.В., Камартдинова Д.Р., Семенова А.Н., Решетник О.А.*

ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»

[kitaevskayas@mail.ru](mailto:kitaevskayas@mail.ru)

**Введение.** В последние годы в технологии хлебопекарного производства за рубежом и в нашей стране широко используют замораживание с целью замедления или прерывания брожения теста и для сохранения готовой продукции. В настоящее время практикуют использование замораживания на различных стадиях технологического процесса: после замеса, на различных этапах расстойки и выпечки полуфабрикатов.

При созревании теста в результате биохимических превращений, обусловленных действием ферментов муки и метаболитов бродильной микрофлоры, состав и свойства теста непрерывно изменяются. Специалисты в данной области утверждают, что замораживание тестовых полуфабрикатов следует производить сразу же после замеса и разделки, исключая при этом стадию брожения. Основанием для подобных выводов практически во всех работах служила сравнительная оценка качественных характеристик размороженных полуфабрикатов и выпеченных изделий. Однако данные исследования объясняют причины, вызывающие ухудшение качества изделий, подвергающихся процессам брожения до стадии замораживания, только гибелью дрожжевых клеток [2], и не рассматривают изменений активности ключевых ферментов муки – протеаз. Учитывая важность влияния протеаз на ход биохимических процессов, происходящих при созревании теста и обуславливающих реологические свойства теста, а также структурно-механические и органолептические свойства готовых изделий, исследования в данной области являются актуальными.

Целью данной работы явилось изучение влияния низкотемпературной обработки на активность протеолитических ферментов тестовых полуфабрикатов из пшеничной и ржаной муки.

**Материалы и методы.** Технологический процесс вели в лабораторных условиях. Замес теста проводили в лабораторной тестомесильной машине в течение 7-10 минут до однородной массы. При замесе теста вносили все необходимые компоненты согласно рецептуре: мука – 100 г, дрожжи прессованные хлебопекарные – 0,7 г, соль поваренная пищевая – 1,5 г, вода питьевая – по расчету. При замесе теста прессованные дрожжи предварительно растворяли в воде в соотношении 1:3. Замес теста влажностью 43 %



осуществляли с использованием охлажденной до 4-6 °С воды. Тестовые заготовки замораживали в морозильной камере при температуре минус 25 - 30 °С. Дефростацию производили при 37 °С в течение 1 - 1,5 часов до достижения температуры в центре заготовки 18 - 20 °С.

Протеолитическую активность определяли методом Вильштеттера и Вальдшмидт-Лейтца в модификации [3]. Данный метод основан на определении свободных карбоксильных групп в спиртовых растворах аминокислот и полипептидов. Протеолитическую активность выражают в количество миллиграммов аминного азота, которое образуется при гидролизе определенного количества 5 % раствора желатина (рН=7,3-7,5) 1 мл вытяжки за 1 час при температуре 40 °С. За единицу протеолитической активности принимают количество фермента, образующего 1 мл аминного азота за 1 ч.

**Результаты.** С целью объективной оценки влияния процессов замораживания на характер поведения ферментов с учетом исключения влияния рецептурных компонентов исследовали образцы: 1 - модельное тесто; 2 - тесто, не подвергавшееся брожению до стадии замораживания; 3 - тесто, подвергавшееся брожению до замораживания.

В качестве модельного теста использовали тесто, приготовленное только из муки (ржаной обдирной или пшеничной высшего сорта в зависимости от экспериментальных задач) и воды с целью выявления характера протекания биохимических процессов с участием собственных ферментов муки под действием низких температур.

Данные о влиянии кратковременной низкотемпературной обработки на активность протеолитических ферментов в тесте представлены на рисунке.

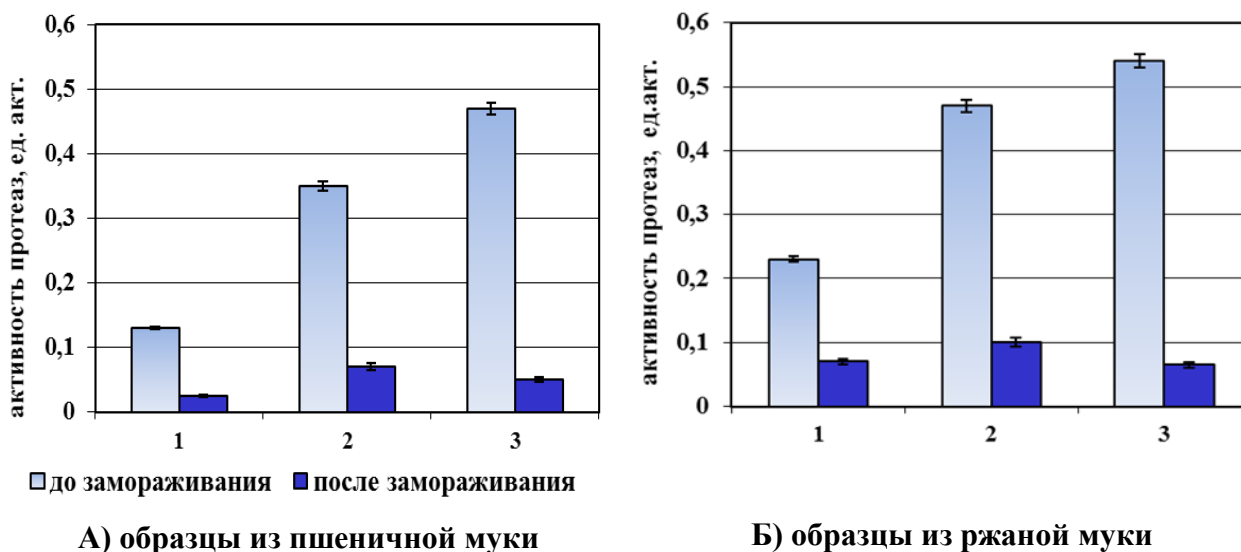


Рисунок - Влияние низкотемпературной обработки тестовых полуфабрикатов на активность протеолитических ферментов

Для изучения влияния низкотемпературной обработки в течение длительного времени исследуемые образцы хранили в упакованном виде в течение 30 сут. при температуре минус 18°С. По мере необходимости тестовые заготовки размораживали и определяли протеолитическую активность. Результаты исследования представлены в таблице.

Таблица - Активность протеолитических ферментов при длительном хранении полуфабрикатов в замороженном виде

Вариант эксперимента	Продолжительность хранения образцов, сут.				
	3	7	14	21	30
Полуфабрикаты из пшеничной муки					
1 – модельное тесто	0,071	0,084	0,119	0,127	0,121
2 - тесто, не подвергавшееся брожению	0,076	0,117	0,157	0,354	0,359
3 – тесто, подвергавшееся брожению	0,101	0,136	0,217	0,409	0,413
Полуфабрикаты из ржаной муки					
1 – модельное тесто	0,025	0,074	0,118	0,132	0,137
2 - тесто, не подвергавшееся брожению	0,07	0,177	0,309	0,462	0,475
3 – тесто, подвергавшееся брожению	0,052	0,128	0,436	0,533	0,542

**Обсуждение.** Анализ данных об изменении активности протеаз в образцах из пшеничной и ржаной муки при кратковременной низкотемпературной обработке показал, что уже через сутки происходит резкое снижение протеолитической активности. Полученные данные, вероятно, можно объяснить гипотезой [4], в которой предполагается, что в результате механического воздействия кристаллов льда происходит разрыв дисульфидных поперечных связей в макромолекулах белка. Это может привести к изменению конформации молекулы фермента, вследствие чего его активность резко снижается. При этом наибольшее уменьшение активности наблюдалось у образцов теста, подвергнутого брожению (из пшеничной муки – на 89,6%; из ржаной муки – на 85,7%).

Из полученных данных видно, что у образцов из ржаной муки протеазы активнее, чем у образцов из пшеничной муки как перед замораживанием, так и после дефростации, то есть влияние низких температур губительнее действовало на активность протеаз пшеничной муки.

Установлено, что в процессе длительного хранения теста в замороженном виде во всех исследуемых образцах наблюдалось увеличение протеолитической активности. Следует отметить, что наиболее интенсивный рост активности протеаз происходил в образцах, приготовленных с использованием дрожжей (в тесте бродившем и не бродившем) по сравнению с образцами модельного теста. Так к концу срока хранения полуфабрикатов в замороженном виде активность протеаз в дрожжевом тесте в 3 раза была выше активности протеаз модельного теста. Полученные результаты объясняются гибелью значительного количества дрожжевых клеток при действии низких температур [2] и высвобождением из них глутатиона – активатора протеолиза, обладающего восстанавливающими свойствами.

Однако, данные, представленные на рисунке, свидетельствуют о том, что и в модельном тесте, приготовленного без использования дрожжей, происходило незначительное увеличение протеолитической активности при длительной низкотемпературной обработке полуфабрикатов.

**Заключение.** Протеолитические ферменты муки активно воздействуют на клейковину, тем самым уменьшают вязкость теста, увеличивают его пластичность и эластичность, в связи с чем сокращается продолжительность замеса тестовых полуфабрикатов для формирования оптимальных структурно-механических свойств. Снижение активности протеаз приводит к укреплению клейковинного каркаса, тесто становится плотным, плохо разрыхляется, что приводит к снижению удельного объема и пористости готовых изделий.

Таким образом, выявлено, что при кратковременном замораживании тестовых полуфабрикатов активность протеаз в тесте резко снижается, тогда как при

продолжительном хранении тестовых полуфабрикатов в замороженном виде протеолитическая активность собственных ферментов муки увеличивается, что следует учитывать при разработке рецептур хлебобулочных изделий на основе криотехнологии.

#### Список литературы

1. Э.О. Герасимова, Н.В. Лабутина Криогенные технологии в хлебопечении. Известия вузов. Пищевая технология. 2019, 1: 6-9.
2. V.O. Selomulyo, W. Zhou Frozen bread dough: Effect of freezing storage and dough improvers. Journal of Cereal Science. 2007, 45: 1-17.
3. В.С Асатиане Ферментные методы анализа. М.: Наука. 1969. 354 с.
4. O. Neureneuf, Van der Plaat Preparation of frozen French bread dough with improved stability. Cereal Chemistry. 1991, 1: 60-66.

### РАЗРАБОТКА БИОДОБАВКИ ДЛЯ ЦЫПЛЯТ БРОЙЛЕРОВ НА ОСНОВЕ ПРОТЕИНАЗЫ БАЦИЛЛ

*Корягина А.О., Рудакова Н.Л., Шарипова М.Р.*

Казанский (Приволжский) федеральный университет

e-mail: [tihonovaao93@gmail.com](mailto:tihonovaao93@gmail.com)

**Введение.** Производство основной продукции птицеводства во многом зависит от генетически обусловленной продуктивности, плодовитости и жизнеспособности птицы, изменяющихся под влиянием условий внешней среды. Применение кормовых ферментов, в частности протеиназ, активно развивающееся направление сельского хозяйства, показывающее активный рост в последнее десятилетие. Многие питательные вещества в кормах находятся в трудно доступной форме и не могут в полном объеме усваиваться птицей. Протеиназы повышают переваримость белковых компонентов, необходимых для роста бройлеров, а также разрушают связи между белками, крахмалом или клетчаткой, что положительно влияет на усвояемость крахмала, повышая его биодоступность [1].

**Материалы и методы.** В работе использовали штамм *B. subtilis* pCS9, несущий ген субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* [2]. Культивирование проводили в биореакторе Biotron LiFlus SP30L. Ферментацию останавливали на 24 ч роста культуры. Клетки удаляли центрифугированием при 5000g в течение 15 мин на центрифуге Beckman Avanti JXN-26. Очистку субтилизиноподобной протеиназы проводили на колонке с карбоксиметилцеллюлозой («Sigma»). Степень чистоты полученных препаратов и их молекулярную массу контролировали электрофоретически. Активность протеиназы определяли по гидролизу азоказеина («Sigma», США) согласно описанию [3]. Влияние различных ингибиторов на активность субтилизиноподобных протеиназ изучали с помощью ингибитора трипсина, о-фенантролина в соотношении фермент : ингибитор 1 : 10, а также PMSF и ЭДТА в соотношении 1 : 1000. Раствор белка инкубировали с ингибитором в течение 1 ч при 37° в Tris-HCl-буфере, pH 8.5.

**Результаты.** Накопление субтилизиноподобной протеиназы в культуральной жидкости достигает максимума к 24 часу. С помощью ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе получили 15886 ед. активности субтилизиноподобной протеиназы для использования в качестве кормовой добавки при кормлении птиц. Полученную ферментную фракцию исследовали в 12.5% ПААГ, было показано наличие белка с молекулярной массой 28 кДа, что соответствует молекулярной массе сериновой протеиназы. Исследовали влияние ингибиторов на субтилизиноподобную протеиназу. Протеиназа в соотношении фермент/ингибитор 1:1000 полностью ингибируется специфическим ингибитором сериновых протеиназ – PMSF и не ингибируется специфическими ингибиторами металлопротеиназ - ЭДТА и о-фенантролином в соотношении фермент/ингибитор 1:100. Активность протеиназы не подавлялась природными ингибиторами, такими как ингибитор трипсина.

**Обсуждение.** Важной характеристикой ферментов с точки зрения их применения в качестве кормовых добавок в птицеводстве является способность сохранять свою стабильность в условиях практического применения. Показано, что ингибиторы не подавляли активность протеиназы. В дальнейшем будет проведен ряд экспериментов для тестирования протеиназы в качестве кормовой добавки.

**Заключение.** Получен очищенный препарат субтилизиноподобной протеиназы в условиях биореактора. Изучено влияние различных ингибиторов на белок. Показано, что протеиназа не подавлялась природными ингибиторами, таким образом, фермент сможет функционировать в желудочно-кишечном тракте птиц.

#### *Список литературы*

1. Kaczmarek S.A., Rogiewicz A., Mogielnicka M., Rutkowski A., Jones R.O., Slominski B.A. The effect of protease, amylase, and nonstarch polysaccharide-degrading enzyme supplementation on nutrient utilization and growth performance of broiler chickens fed corn-soybean meal-based diets. *Poultry Sci.*, 2014, 93(7): 1745-1753 (doi: 10.3382/ps.2013-03739).
2. Mikhailova E.O., Mardanov A.M., Balaban N.P., Rudenskaya G.N., Ilyinskaya O.N., Sharipova M.R. Biochemical properties of *Bacillus intermedius* subtilisin-like proteinase secreted by a *Bacillus subtilis* recombinant strain in its stationary phase of growth. *Biochemistry (Mosc.)*, 2009, V.74(3): 308-15.
3. Demidyuk I.V., Romanova D.V., Nosovskaya I.V., Demidyuk E.A., Chestukhina G.G., Kuranova I.P., Kostrov S.V. Modification of substrate-binding site of glutamyl endopeptidase from *Bacillus intermedius*. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2004, 17(5): 411-416 (doi: 10.1093/protein/gzh050).

*Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров, а также при поддержке РФФИ (проект № 16-16- 04062).*

# СИНТЕЗ ВОДОРАСТВОРИМЫХ АМИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПИЛЛАР[5]АРЕНА И ИХ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНАЯ САМОСБОРКА С ТЕТРАЗОЛСОДЕРЖАЩИМИ ПОЛИМЕРАМИ

*Махмутова Л.И., Шуртик Д.Н., Стойков И.И.*

Химический институт им. А. М. Бутлерова КФУ, Казань, Россия

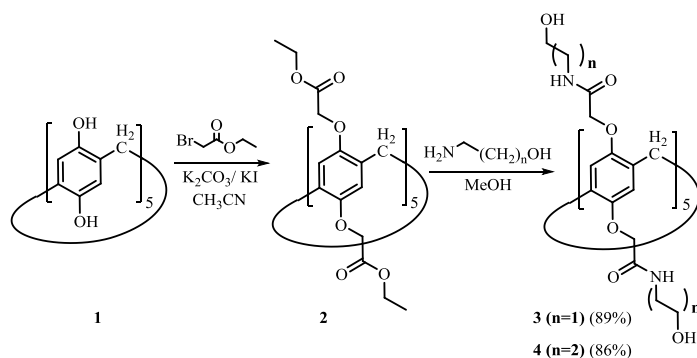
[lays\\_9393@mail.ru](mailto:lays_9393@mail.ru), +79178705843

**Введение.** В настоящее время полимерные композиции на основе поливинилтетразолов (ПВТ) рассматриваются как перспективные носители для формирования систем целевой доставки лекарственных препаратов<sup>1</sup>. Однако, полимерные композиции на основе ПВТ не образуют устойчивых наноразмерных агрегатов в водных растворах<sup>2</sup>. Для создания из полимерных композиций наноразмерных частиц с заданной формой и размерами<sup>2</sup> применяются полифункциональные макроциклические соединения<sup>3,4</sup>. Полифункциональные макроциклические соединения обладают рядом привлекательных характеристик, таких как наличие предорганизованной пространственной структуры, макроциклической полости, участвующей в формировании систем типа гость—хозяин, и наличие функциональных групп, регулирующих рецепторные свойства макроциклической системы<sup>3,4</sup>. На сегодняшний день наиболее перспективными макроциклическими соединениями являются представители нового класса *пара*-циклофанов — пиллар[*n*]арены<sup>5</sup>.

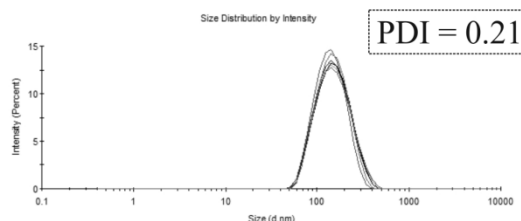
**Материалы и методы.** Проведен детальный анализ спектральных данных (УФ-, ИК-спектры и спектры ЯМР <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, NOESY и HSQC), позволивший установить пространственную структуру синтезированных макроциклов, а состав подтвержден данными элементного анализа и масс-спектрометрии. Изучены агрегационные свойства полученных соединений с водорастворимыми тетразолсодержащими полимерами: поли-5-винилтетразолом (ПВТ) и поливинил(тетразол-2-ил)этиловым эфиром (ПВТЭ) методом ДСР. Морфология образующихся частиц установлена методом просвечивающей электронной микроскопии.

**Результаты.** Впервые синтезированы незаряженные, водорастворимые производные пиллар[5]арена **3** и **4**, содержащие фрагменты 2-амидоэтанола и 3-амидопропанола. Методами ДСР, УФ-спектроскопии и спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C и двумерной спектроскопии ЯМР показана ассоциация макроцикла **3** с поливинил(тетразол-2-ил)этиловым эфиром (ПВТЭ).

**Обсуждение.** В результате ассоциации макроцикла **3** с ПВТЭ образуются монодисперсные наноразмерные, значение индекса полидисперсности которых составляет 0.21. По данным СЭМ ассоциаты **3**/ПВТЭ имеют сферическую форму и средний диаметр 117 нм. С помощью двумерной спектроскопии ЯМР NOESY и DOSY показано, что в процессе ассоциации пиллар[5]арена **3** с ПВТЭ образуются комплексы включения фрагментов тетразола ПВТЭ в полость пиллар[5]арена **3**.



**Схема 1**



**Закключение.** Супрамолекулярная самосборка наноразмерных ассоциатов ПВТ и ПВТЭ с незаряженными водорастворимыми производными пиллар[5]арена, содержащими фрагменты 2-амидоэтанола и 3-амидопропанола, открывает дополнительные возможности применения высокомолекулярных производных тетразолов и их супрамолекулярных ассоциатов заданной морфологии в персонализированной медицине и высокотехнологичном здравоохранении при создании новых терапевтических агентов направленного действия.

#### Список литературы

1. В. Н. Кижняев, Л. И. Верещагин, Успехи химии, 2003, **72**, 159 [V. N. Kizhnyayev, L. I. Vereshchagin, Russ. Chem. Rev., 2003, **72**, 143].
2. В. Н. Кижняев, Ф. А. Покатилов, Р. Г. Житов, А. Г. Пройдаков, Э. А. Крахоткина, Высокомолекуляр. соединения, Сер. Б, 2015, **57**, 363 [V. N. Kizhnyayev, F. A. Pokatilov, R. G. Zhitov, A. G. Proidakov, E. A. Krakhotkina, Polym. Sci., Ser. B (Engl. Transl.), 2015, **57**, 504].
3. Y. Chen, S. Sun, D. Lu, Y. Shi, Y. Yao, Chin. Chem. Lett., 2019, **30**, 37.
4. O. A. Mostovaya, P. L. Padnya, D. N. Shurpik, A. A. Vavilova, V. G. Evtugyn, Yu. N. Osin, I. I. Stoikov, Macroheterocycles, 2017, **10**, 154.
5. T. Ogoshi, T. Kakuta, T. A. Yamagishi, Angew. Chem., 2019, **131**, 2219.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 18-03-00315, № 18-33-01095, № 18-33-00276).*

# "УМНЫЕ" СТРОИТЕЛЬНЫЕ БЛОКИ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ СТРУКТУР НА ОСНОВЕ МОНОФОСФОРИЛИРОВАННЫХ ПИЛЛАР[5]АРЕНОВ

*Назарова А.А., Гилязева А.И., Падня П.Л., Стойков И.И.*

Химический институт им. А. М. Бутлерова, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

[anas7tasia@gamil.com](mailto:anas7tasia@gamil.com), +79961211369

**Введение.** Загрязнение тяжелыми металлами сточных вод и природных водоемов зачастую обусловлено отходами различных отраслей промышленности, таких как металлургия, добыча полезных ископаемых, кожевенные заводы, производство сплавов и аккумуляторных батарей. Это связано не только с их токсичностью, но и с их биомагнификацией. Тяжелые металлы могут накапливаться в организме человека, вызывая отравление и, как следствие, различные заболевания и расстройства. В связи с этим выявление тяжелых металлов имеет первостепенное значение.

**Материалы и методы.** Монозамещенные пиллар[5]арены, содержащие фосфонатный и 1-аминофосфонатный фрагменты.  $\text{LiNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CsNO}_3$ . Электронная спектроскопия поглощения, динамическое рассеяние света, спектроскопия ЯМР.

**Результаты.** Был успешно получен монозамещенный пиллар[5]арен, содержащий РО-фрагмент. Пиллар[5]арены, содержащие фосфонатные и аминофосфонатные фрагменты, продемонстрировали эффективность распознавания катионов металлов, а именно,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ . Их способность к комплексообразованию по отношению к этим катионам была оценена методом электронной спектроскопии поглощения. Было установлено, что пиллар[5]арен, содержащий фосфонатный фрагмент, способен связывать мягкие кислоты ( $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) в рамках теории ЖМКО. Введение в структуру макроцикла аминофосфонатного фрагмента способствовало связыванию, как мягких ( $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ), так и жестких кислот ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ). При помощи динамического рассеяния света было установлено, что полученные соединения образуют ассоциаты с катионами  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  и  $\text{Pb}^{2+}$ .

**Обсуждение.** Интенсивное развитие химии фосфорсодержащих макроциклических соединений представляет большой интерес для учёных, позволяя создавать новые типы супрамолекулярных и координационных систем и изучать молекулярное распознавание. Фосфорорганические фрагменты, введенные в макромолекулярную систему и обладающие высокой координирующей способностью, могут существенно влиять на ее комплексообразующие свойства. Таким образом, дизайн макроциклов, функционализированных фосфорсодержащими фрагментами, является одним из приоритетных направлений развития современной органической химии, поскольку объединение макроциклической платформы и фосфорорганических заместителей может привести к получению высокоэффективных лигандов и комплексообразующих агентов.

С момента появления первой работы, посвященной синтезу пиллар[5]аренов, к настоящему моменту в литературе представлен ряд работ, описывающих связывание пиллараренов с широким кругом гостей: от катионов металлов (экстракция) до

противораковых препаратов (целевая доставка лекарственных средств). Особое внимание среди этих работ привлекают пиллар[5] и пиллар[6]арены с фосфорсодержащими заместителями. Стоит отметить, что количество работ, посвященных синтезу моно- и дизамещенных пиллар[5]аренов, функционализированных фосфорсодержащими фрагментами, значительно меньше по сравнению декафосфорилированными пиллараренами.

Таким образом, целью данной работы является синтез монозамещенных пиллар[5]аренов, содержащих фосфонатный и 1-аминофосфонатный фрагмент, а также изучение их комплексообразующих и агрегационных свойств по отношению к некоторым катионам металлов.

**Заключение.** Полученные результаты открывают большие перспективы для создания новых материалов и их применения в качестве катализаторов на основе фосфорилированных пиллар[5]аренов.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ грант №18-33-00276 мол\_а.*

## **МИГРАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА, НАГРУЖЕННЫХ СИНТЕТИЧЕСКИМИ МИКРОКАПСУЛАМИ**

*М. Ю. Никитина, Т. А. Невзорова, А. Г. Даминова, Е. Н. Аточина-Вассерман,  
Р. И. Литвинов*

НИЛ «Белково-клеточные взаимодействия», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Казань, Российская Федерация

[mn1994@yandex.ru](mailto:mn1994@yandex.ru), 8-951-894-66-30

**Введение.** Направленный транспорт лекарственных веществ является актуальной проблемой современной биологии и медицины, поскольку лекарственные препараты, попадая в организм, затрагивают не только пораженные зоны, но и здоровые органы и ткани, вызывая побочные эффекты. Использование систем направленного транспорта позволяет доставлять препарат напрямую к органу-мишени. Полиморфноядерные лейкоциты (нейтрофилы) были исследованы в качестве потенциальных переносчиков инкапсулированных терапевтических агентов в области острого воспаления.

**Материалы и методы.** Нейтрофилы выделяли из крови здоровых доноров и инкубировали их с синтетическими микрокапсулами в течение 20 минут для интернализации микрокапсул. Миграционную способность нейтрофилов после интернализации микрокапсул оценивали с использованием вставок для 24-луночного планшета с размером пор 5 мкм и создавая градиент хеммоаттрактанта интерлейкина-8 (IL-8). Для подтверждения интернализации микрокапсул использовали метод проточной цитометрии и трансмиссионной электронной микроскопии. Для оценки жизнеспособности нейтрофилов на всех этапах эксперимента использовали метод проточной цитометрии.

**Результаты.** Наши результаты показали, что нейтрофилы, нагруженные микрокапсулами, сохраняют жизнеспособность до 4-х часов и проявляют миграционную



активность после нагрузки микрокапсулами. Однако наличие микрокапсул почти в 2,5 раза снижает миграционную способность нейтрофилов (в среднем около 11%) в сравнении с нейтрофилами без микрокапсул (25%).

**Обсуждение.** Предполагается, что снижение миграционной активности нейтрофилов, нагруженных микрокапсулами, связано с цитотоксическим эффектом микрокапсул.

**Заключение.** Полученные результаты показывают, что нейтрофилы имеют потенциал для использования в системах направленного транспорта, но необходимо дополнительно изучить взаимодействие нейтрофилов и микрокапсул.

Работа выполнена по Программе повышения конкурентоспособности КФУ и гранта 19-015-00075 РФФИ.

## ВЛИЯНИЕ КАОЛИНА ПОКРЫТОГО ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТАМИ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

*Нуриева Ч. К., Рожина Э.В., Фахруллин Р.Ф.*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, НИЛ «Бионанотехнологии»

[chulpan.nurieva.97@gmail.com](mailto:chulpan.nurieva.97@gmail.com), +79874112693

**Введение.** Каолин - это глинистый минерал планарной формы. Термин «каолин» происходит от китайского топонима Gaoling (от китайского «высокие горы») в юго-восточной провинции Цзян Си в Китае, где этот вид сырья уже давно используется для изготовления фарфоровой посуды и предметов искусства. Каолинит входит в группу глинистых минералов слоистых силикатов. Также в эту группу входят диккит, накрит и галлуазит [1]. Данные глины являются продуктом выветривания алюмосиликатов и силикатов магматических и метаморфических горных пород, имеют общую формулу  $Al_2Si_2O_5(OH)_4$ . Чистый каолинит имеет состав, выраженный в оксидах: 46,54%  $SiO_2$ , 39,50%  $Al_2O_3$  и 13,96%  $H_2O$  [2]. Каолин используется в производстве бумаги, керамики, резины, пластмассы, лакокрасочных изделий, в косметике, в фармацевтике. Реализуются работы по созданию нанокомпозитов на основе каолина, с улучшенными реологическими, термическими и органическими свойствами для использования в технике и медицине. Несмотря на отсутствие токсичности каолина на клетки, неоднородность поверхностного заряда может снизить проникновение и доставку каолина в клетку. Актуальной является модификация каолина поликатионами. Целью данной работы было исследование влияние каолина, покрытого поли (аллиламин) гидрохлоридом, на пролиферативную активность и жизнеспособность раковых клеток шейки матки человека (HeLa) при совместной инкубации.

**Материалы и методы.** Раковые клетки шейки матки человека были приобретены из Американской коллекции типовых культур (АТСС). Клетки культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с добавлением 10 % инактивированной фетальной бычьей сыворотки, L- глутамина и антибиотика 100 ЕД мл<sup>-1</sup> пенициллина и 100 нг мл<sup>-1</sup> стрептомицина в атмосфере с 5% содержанием  $CO_2$  при 37° С в  $CO_2$ -инкубаторе. Поли (аллиламин) гидрохлорид (ПАГ, Mw 70 кДа), 3- [4,5-диметилтиазол-2-ил] -2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ), 4', 6-диамино-2-фенилиндол дигидрохлорид

(ДАФИ), диметилсульфоксид (ДМСО) были приобретены в компании Sigma-Aldrich. В целях стерилизации наночастицы нативного каолина перед использованием промывали этанолом (70 %) и дистиллированной водой. Каолин смешивали с полиэлектролитом в соотношении 1:3 и инкубировали в течение 24 часов на ротаторе. Избыток несвязанного полиэлектролита удаляли трехкратной отмывкой дистиллированной водой и центрифугировали. Для измерения гидродинамического диаметра и дзета потенциала синтезированных наночастиц использовали прибор Zetasizer Nano ZS (Malvern). Перед посевом производили подсчет клеток на слайдовом цитометре (Tali™ Thermo Fisher Scientific). Раковые клетки шейки матки человека (HeLa) культивировали в 96-луночных планшетах из расчета 4000 клеток на лунку, через 24 ч к ним добавляли нативный каолин и каолин с ПАГ-покрытием в концентрации от 5 до 50 мкг на мл. Для оценки цитотоксического потенциала нативного каолина и каолина, покрытого поликатионом, исследовали активность дыхательных ферментов с использованием колориметрического МТТ-теста. Желтая соль МТТ преобразуется ферментами сукцинатдегидрогеназами до фиолетовых кристаллов формазана, накапливающихся в цитоплазме живых клеток. Таким образом, количество формазана, образующегося в клетках, пропорционально количеству живых клеток. Оптическая плотность определяли при 540 нм с использованием микропланшетного фотометра (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific). Влияние каолина, покрытого поликатионом на морфологию ядра клеток HeLa, исследовали с помощью оптической микроскопии. Клетки фиксировали 4% параформальдегидом, промывали фосфатно-солевым буфером и окрашивали ДНК-специфичным красителем ДАФИ (0,1 мкг мл<sup>-1</sup>) в течение 5 мин. Визуализацию морфологии ядра в темном поле получили с использованием темнопольного конденсора CytoViva, прикрепленного к вертикальному микроскопу Olympus BX51, оснащенного объективом 100x и DCD CCD-камерой.

**Результаты.** Эффективность функционализации планарных наночастиц каолина поликатионом оценивали по измерению дзета-потенциала. В результате покрытия у нативного каолина изменился размер и заряд. У нативного каолина заряд составлял -28,8±2,07 мВ, а у покрытого 30,6±1,07 мВ. При концентрации 50 мкг/мл наблюдалось снижение пролиферативной активности клеток для нативного каолина на 40%, для каолина, модифицированного поли (аллиламин) гидрохлоридом на 35%.

**Обсуждение.** Исследовано влияние каолина на различные клеточные линии млекопитающих [3,4]. Однако раковые клетки шейки матки человека (HeLa) ранее не использовались в экспериментах с каолином. В данной работе исследовалось влияние каолина, покрытого поликатионом на пролиферативную активность и жизнеспособность раковых клеток шейки матки человека (HeLa). Визуализация наночастиц каолина и каолина, покрытого полиэлектролитом, с использованием темнопольной микроскопии показывает, что они активно усваиваются клетками. Влияние наноматериалов на пролиферативную активность клеток HeLa определяли с использованием МТТ-теста, оценивая активность клеточных гидрогеназ [5] через 24 часа после добавления наноматериала. При концентрации 50 мкг/мл наблюдалось снижение пролиферативной активности клеток для нативного каолина на 40%, для каолина, модифицированного поли (аллиламин) гидрохлоридом на 35%.

**Заключение.** Отработана методика модифицирования планарной наноглины каолина поликатионом. Модификация каолина не влияла на проницаемость последнего для клеток, что было продемонстрировано с использованием темнопольной микроскопии.

### Список литературы

1. R. T Cygan, K. Tazaki. Interactions of Kaolin Minerals in the Environment. Elements. 2014, 10(3), 195–200.
2. S. Mathur. Kaolin Flotation. Journal of Colloid and Interface Science. 2002, 256(1), 153–158.
3. M.C. Jaurand, J.C. Pairon. Review on short-term tests used for the toxicological evaluation of phyllosilicates. Health Related Effects of Phyllosilicates. 1990, 21, 331-347.
4. P.A. Schroeder; G. Erickson. Kaolin: From Ancient Porcelains to Nanocomposites. Elements. 2014, 10, 177-182.
5. M. V. Berridge, P. M. Herst and A. S. Tan, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. Int. J. Pharmacol. 2005, 11, 127–152.

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

## СОЗДАНИЕ ЭФФЕКТИВНОЙ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ НА ОСНОВЕ КОНСТИТУТИВНОГО ПРОМОТОРА DEGQ КЛЕТОК *B. SUBTILIS*

## CREATION OF AN EFFECTIVE EXPRESSION SYSTEM BASED ON THE CONSTITUTIVE DEGQ PROMOTER OF *B. SUBTILIS* CELLS

Ф.Р. Османова, А.О. Корягина

ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет

e-mail: [Osm210799@mail.ru](mailto:Osm210799@mail.ru)

**Введение.** Разработка новой системы экспрессии рекомбинантных белков с сильным промотором и использованием в качестве штамма-продуцента клеток *B. subtilis*, позволяющих секретировать ценные гидролитические ферменты непосредственно во внеклеточную среду, имеет значительный промышленный интерес и практическое значение в области биомедицины. Достоинства использования грамположительной почвенной бактерии *Bacillus subtilis* в области микробиологической промышленности заключаются в том, что она имеет статус GRAS (generally recognized as safe), то есть является непатогенной и представляется возможность ее использования в пищевой промышленности, последовательность ее генома, наряду с транскриптомными и протеомными широкими ответами на различные условия окружающей среды, полностью определена. Также, что важно для штамма-продуцента, рост клеток при культивировании производится с высокой скоростью и плотностью, что позволяет получить большой выход фермента за малый промежуток времени. Промотор, как важный регуляторный элемент, непосредственно влияет на эффективность экспрессии белка, и сильный промотор позволит добиться высокой экспрессии генов.

Целью настоящей работы являлся анализ экспрессии сериновых протеиназ *Bacillus pumilus* (AY754946.2, Y15136.1, EU678894.2) под контролем конститутивного промотора *degQ* *B. subtilis*.

**Материалы и методы.** Гены ферментов (глутамилэндопептидазы, субтилизиноподобной протеиназы и металлоэндопептидазы) клонировали на мультикопийной плазмиде pGP382. Вектор pGP382 содержит модифицированный конститутивный промотор гена *degQ*. Ген *degQ* кодирует полипептид DegQ, состоящий из 46 аминокислот, который стимулирует фосфорилирование DegU с помощью DegS. Фосфорилированная форма белка DegU (DegU~P) активирует экспрессию более 120 генов бацилл, включая гены протеолитических ферментов. Замена единственного нуклеотида в регионе «-10» позволила получить конститутивную активность промотора PdegQ36. За 3'-концом промотора PdegQ36 на векторе pGP382 расположен полилинкер из 11 сайтов рестрикции, за которым следует *Streptag* пептидная последовательность (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys), позволяющая проводить эффективную очистку путем аффинной хроматографии.

**Результаты.** В результате были получены рекомбинантные векторы, содержащие гены субтилизиноподобной протеиназы, глутамилэндопептидазы и металлоэндопептидазы, которые были трансформированы в штамм *B. subtilis* BG2036, дефектный по генам двух протеиназ. Показано, что максимальная активность ферментов приходится на 14-20 час роста, с максимумом 1,2 усл.ед.

**Обсуждение.** С целью повышения продукции гетерологичных белков, рекомбинантные конструкции (вектор+ген) будут трансформированы в штаммы *B. subtilis* с минимальным геномом.

**Заключение.** Мы предполагаем, что разработанные рекомбинантные конструкции в сочетании с эффективными штаммами могут быть рекомендованы в качестве технологической основы для получения рекомбинантных белков.

#### *Список литературы*

1. Nobuchika Takesue, Teruo Sone, Michiko Tanaka, Fusao Tomita, and Kozo Asano. Effect of an additionally introduced *degQ* gene on di-D-fructofuranosyl 2,6':2',6 anhydride (DFA IV) production by recombinant *Bacillus subtilis* in a single culture production system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009.
2. Christina Herzberg, Lope Andrés Flórez Weidinger, Bastian Dörrbecker, Sebastian Hübner, Jörg Stülke and Fabian M. Commichau. SPINE: A method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions in vivo. *Proteomics*, 2007.
3. Sarah Guiziou, Vincent Sauveplane, Hung-Ju Chang, Caroline Clerté, Nathalie Declerck, Matthieu Jules, Jerome Bonnet. A part toolbox to tune genetic expression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 2016 Sep 6.

*Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РФФИ № 19-08-00853\_A. Работа поддержана грантом Академии Наук Республики Татарстан № 10-49-Ч з 2019.*

## РОТАКСАНОВЫЕ СТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ МОНОФОСФОРИЛИРОВАННЫХ ПИЛЛАР[5]АРЕНОВ

*Потрекеева О.С., Назарова А.А., Стойков И.И.*

Химический институт им. А. М. Бутлерова, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

[olga-potrekeeva@mail.ru](mailto:olga-potrekeeva@mail.ru), +79274164505

**Введение.** В XX веке были созданы разнообразные органические, элементоорганические и металл-координационные полимеры и материалы на их основе, что в конечном итоге привело к объединению координационной, супрамолекулярной и полимерной химии и появлению супрамолекулярных полимеров. В настоящее время супрамолекулярные полимеры привлекают пристальное внимание исследователей с точки зрения дизайна биосовместимых материалов нового поколения с биомиметическими свойствами, способных к самозалечиванию.

**Материалы и методы.** Монозамещённые пиллар[5]арены, содержащие 1-аминофосфонатный фрагмент. Одномерная и двумерная спектроскопия ЯМР, ИК спектроскопия.

**Результаты.** Синтезированы новые монозамещённые пиллар[5]арены, содержащие 1-аминофосфонатные фрагменты. Установлено, что введение *N*-(аминоалкил)амидной группы приводит к образованию комплексов самовключения таким образом, что в макроциклической полости пиллар[5]арена находится четыре метиленовых фрагмента алкильного заместителя. Образованию стабильных комплексов самовключения способствует наличие сильной водородной связи между NH-протонами и кислородом метоксильного фрагмента, что подтверждается данными ИК-спектроскопии. Кроме того, было установлено, что введение объёмной фосфорильной группы в структуру пиллар[5]аренов, содержащих *N*-(аминоалкил)амидный фрагмент, приводит к формированию ротаксановых структур.

**Обсуждение.** На сегодняшний день описан ряд работ, посвященных синтезу моно- и деказамещённых пиллараренов, способных образовывать супрамолекулярные полимеры по типу «голова к хвосту», где происходит включение заместителя одного макроцикла в обогащенную электронами полость соседнего макроцикла. В связи с этим несомненный интерес представляет изучение возможности образования различных типов ассоциатов – ротаксанов/псевдоротаксанов, супрамолекулярных полимеров, псевдоузлов и супрамолекулярных узлов - в зависимости от природы растворителя и длины линейных алкильных фрагментов в монозамещённых макроциклах.

Таким образом, целью данной работы является синтез ряда монозамещённых пиллар[5]аренов, содержащих 1-аминофосфонатный фрагмент, а также изучение их пространственного строения посредством одномерной и двумерной спектроскопии ЯМР, а также ИК спектроскопией.

**Заключение.** Разработанный синтетический подход к формированию ротаксановых структур с высокими выходами на платформе пиллар[5]аренов, содержащих *N*-(аминоалкил)амидный фрагмент, основанный на склонности синтезированных соединений к самовключению заместителя в макроциклическую полость, и применение фосфорильной группы в качестве блокирующей открывает возможность получения новых молекулярных машин.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ грант №18-33-00276 мол\_а.,*

# ДЕЙСТВИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ, ПЕРОКСИДАЗЫ И НАКОПЛЕНИЕ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА У РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ *Triticum aestivum* L. ПРИ ДОБАВЛЕНИИ В СРЕДУ МЕДИ

Рахматуллина Светлана Рифовна

Башкирский государственный университет

[r.sveta@inbox.ru](mailto:r.sveta@inbox.ru) 89174229362

**Введение.** В настоящее время приобретает все большую актуальность изучение последствий загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ), являющимися сильными стресс-факторами и токсикантами, и оказывающими влияние на физиолого-биохимические процессы в клетках. В условиях избытка солей тяжелых металлов в растениях возникает состояние окислительного стресса, сопровождающееся образованием активных форм кислорода (АФК) и перекисным окислением липидов (ПОЛ). Действие меди в избыточном количестве нарушает физиологические и биохимические процессы в клетках [1]. При поступлении тяжелых металлов в растениях активируются системы защиты, направленные на поддержание гомеостаза. К механизмам защиты относятся: активация ферментов стресса каталазы, пероксидазы, супероксиддисмутазы; суперпродукция осмолитов в ответ на металл-индуцированный водный стресс; изменение физико-химических свойств клеточных оболочек; синтез полиаминов; изменение гормонального баланса; синтез металлсвязывающих соединений и стрессовых белков - все они обеспечивают выживание организма и его адаптацию при стрессовых воздействиях.

В защитной реакции растений при действии тяжелых металлов важное значение играет салициловая кислота (СК), оказывающая регуляторное действие на физиологические и биохимические процессы в растениях [2]. Салициловая кислота может рассматриваться в качестве стимулятора роста растений и модулятора про и антиоксидантной системы [3]. В ряде работ приводятся свидетельства протекторной роли салициловой кислоты при действии на растения некоторых форм абиотического стресса, в том числе тяжелых металлов [2].

**Материалы и методы.** Объектом исследования были растения пшеницы *Triticum aestivum* L. (сорт Казахстанская 10). Для изучения влияния 0.05 мМ раствора салициловой кислоты применяли предпосевную обработку семян в течение 3 ч. Для изучения влияния меди использовали раствор  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Растения выращивали при освещении люминесцентными лампами ЛД-20 и лампами накаливания («УЛЗ», Россия), освещенность 120 Вт/м<sup>2</sup>, светопериод 16 ч, средняя температура воздуха 24 ± 2°С. Определение активности гваяколпероксидазы и каталазы проводили согласно методики. Содержание продукта перекисного окисления липидов - малонового диальдегида определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [4].

**Результаты.** Избыточные концентрации ТМ в окружающей среде приводят к различным нарушениям метаболизма растений. Источниками загрязнения почв медью являются горнодобывающая и перерабатывающая промышленность, а также агропромышленное производство, использующее препараты меди для борьбы с болезнями и вредителями.

Известно, что ТМ являются мощным индуктором окислительного стресса и образования относительно стабильного продукта перекисного окисления липидов в клетке - малонового диальдегида. Во всех вариантах эксперимента в присутствии меди уровень МДА повышался, что связано с возникновением состояния окислительного стресса. СК снижала уровень МДА, способствуя тем самым улучшению антиоксидантного баланса в клетках исследуемых растений и уменьшению в них процессов ПОЛ.

При стрессах разной природы возникает серьезный дисбаланс между процессами образования и ликвидации АФК. Одним из способов защиты растений в состоянии окислительного стресса является активация антиоксидантных ферментов - пероксидазы, каталазы.

**Обсуждение.** Установлено, что при действии меди содержание МДА возрастало во всем растении, в побегах на 41,18% и в корнях на 30,43%. Интенсивность ПОЛ в растениях обработанных салициловой кислотой ниже, в сравнении с растениями на меди. Обработка салициловой кислотой приводила к снижению содержания МДА в побегах на 33,34% и в корнях на 22,23%.

Содержание малонового диальдегида, продукта перекисного окисления липидов, свидетельствует о поражении мембранных липидов в результате их окисления активными формами кислорода. МДА - это цитотоксический продукт перекисного окисления липидов, индикатор образования свободных радикалов и последующего повреждения клеток и тканей.

В ходе работы установлено, что при действии меди активность каталазы снижалась - в побегах на 36,85%, в корнях на 20,94%. Обработка растений салициловой кислотой приводила к увеличению активности каталазы в побегах на 44,44%. Медь оказывала угнетающее действие на активность пероксидазы, значительнее это наблюдалось в корнях - на 14,59%. Выявлено, что обработка СК приводила к увеличению активности пероксидазы в корнях на 23,78%.

Из литературных данных известно, что активация пероксидазной системы при действии тяжелых металлов является характерной адаптивной реакцией, которую обычно связывают с защитой растения от окислительного стресса. Помимо этого, активация гваяколовых пероксидаз способствует развитию процессов суберинизации и лигнификации [5].

**Заключение.** Салициловая кислота влияет на про- антиоксидантный баланс, уменьшая накопление продукта перекисного окисления липидов - малонового диальдегида и повышая активность антиоксидантных ферментов - пероксидазы и каталазы.

#### Список литературы

1. С.Р. Деви, М.Н.В. Прасад. Антиокислительная активность растений *Brassica juncea*, подвергнутых действию высоких концентраций меди // Физиология растений. 2005. Т. 52. № 2. С. 233-237.
2. T. Janda, E. Horvath, G. Szalai, E. Paldi. Role of salicylic acid in the induction of abiotic stress tolerance // Springer. 2007. P. 91-150.
3. C. Norman, H.A. Katharine, H.A. Millar, J.M. Whelan, D.A. Day. Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport // Plant Physiol. 2004. V. 134. P. 492 - 501.
4. R.L. Heath, L. Packer. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. 1968. V. 125. P. 189-198.

5. В.П. Холодова, К.С. Волков, Вл.В. Кузнецов. Адаптация к высоким концентрациям солей меди и цинка растений хрустальной травки и возможность их использования в целях фиторемедиации // Физиология растений. 2005. Т. 52. № 6. С. 848-858.

## ПОЛУЧЕНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ СЕМЯН КАРТОФЕЛЯ С ПОСЛЕДУЮЩИМ ИЗУЧЕНИЕМ ИХ СКОРОСТИ ДЕГИДРАТАЦИИ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ХРАНЕНИЯ

*Тимаков Алексей Александрович, Сергеев Роман Владимирович*

Поволжский Государственный Технологический Университет

[timach@mail.ru](mailto:timach@mail.ru), +79278871281

**Введение.** Искусственные семена - это технология, созданная с целью применения соматических эмбрионов либо другого растительного материала (например, меристем) в качестве аналогов обычным, традиционным семенам [1, 2]. Однако, поскольку сами меристемы (или другие скопления растительных клеток) без защитных оболочек и источника питательных веществ быстро дегидратируются и погибают, создание искусственной защитной оболочки с запасом питательных веществ призвано решить эту проблему [2]. На сегодня Россия не располагает дешевой альтернативой для компактного хранения и перевозки выращенного *in vitro* растительного материала. Массовое получение гомогенного растительного материала (эмбрионов, меристем и т. д) с последующим переносом на специализированную оболочку позволит снизить себестоимость производства посадочного материала [2, 3].

**Материалы и методы.** Чашки Петри; пластиковый шприц, 20 мл; Phytoglobe Belvetorix, 1%; меристемы *Solanum Tuberosum L.* сортов «Ред Скарлет», «Вега», «Импала» (только фрагменты побегов, длиной до 1-1.5 мм); раствор хлорида кальция, 0.1 моль; жидкая питательная среда с 2% альгината натрия.

В рамках эксперимента была заложена серия опытов, в которых питательная альгинатная среда (содержащая либо не содержащая 1% Phytoglobe Belvetorix) с диспергированными фрагментами меристем растений была капельным методом перенесена в раствор хлорида кальция, в результате чего меристемы и среда инкапсулировались в оболочке альгината кальция. Капсулы дополнительно выдерживались в растворе хлорида кальция в течение 15 минут до полного застывания, после чего извлекались и помещались в стерильные чашки Петри. Чашки Петри затем помещались либо в холодильную камеру с температурой +4 градуса по Цельсию, либо в световую комнату с температурой +24 градуса по Цельсию. Спустя 10 дней проводился подсчет гидратированных и дегидратированных капсул, контаминированных, жизнеспособных и нежизнеспособных эксплантов в капсулах.



Таблица 1. Схема эксперимента по инкапсуляции меристем трех сортов *Solanum tuberosum L.* с добавкой/без средства PhytoGlobe Belvetorix

Вариант опыта	Номер опыта и название сорта	Световая комната/холодильник	Наличие PhytoGlobe Belvetorix	Число капсул
1.	Ред Скарлет	Свет	Да	2x10
2.		Свет	Нет	2x10
3.		Холод	Да	2x10
4.		Холод	Нет	2x10
5.	Вега	Свет	Да	2x10
6.		Свет	Нет	2x10
7.		Холод	Да	2x10
8.		Холод	Нет	2x10
9.	Импала	Свет	Да	2x10
10.		Свет	Нет	2x10
11.		Холод	Да	2x10
12.		Холод	Нет	2x10

### Результаты

Таблица 2. Результаты эксперимента по инкапсуляции меристем трех сортов *Solanum tuberosum L.* с добавкой/без средства PhytoGlobe Belvetorix, состояние альгинатных капсул спустя 10 дней

Сорт	Наличие Belvetorix	Температура, °С	Доля гидратированных капсул, %	Доля дегидратированных капсул, %
Вега	0	4	100,0%	0,0%
Ред Скарлет	0	4	60,0%	40,0%
Импала	0	4	100,0%	0,0%
Вега	1	4	100,0%	0,0%
Ред Скарлет	1	4	90,0%	10,0%
Импала	1	4	60,0%	40,0%
Вега	0	24	0,0%	100,0%
Ред Скарлет	0	24	0,0%	100,0%
Импала	0	24	0,0%	100,0%
Вега	1	24	0,0%	100,0%
Ред Скарлет	1	24	0,0%	100,0%
Импала	1	24	0,0%	100,0%

**Обсуждение.** Во-первых, нельзя сделать однозначных выводов о влиянии Belvetorix на контаминирование искусственных семян, но можно сделать вывод о том, что Belvetorix не наносит вреда эксплантам в использованной концентрации. Во-вторых: 1. Альгинатные капсулы, полученные вышеуказанным методом, остаются гидратированными гораздо дольше при хранении в условиях пониженных температур (+4 градуса Цельсия) в негерметичной таре. 2. Альгинатные капсулы, полученные вышеуказанным способом, дегидратируются полностью в течение 10 дней при хранении в условиях комнатной температуры (+24 градуса Цельсия) в негерметичной таре.

**Заключение.** Искусственные семена – технология, которая позволяет получать в больших количествах оздоровленный посадочный материал за счет использования методов размножения *in vitro*. Благодаря использованию этой технологии можно решить большинство проблем, связанных с лесовосстановлением, сохранением элитных сортов растений в сельском хозяйстве и др.

#### *Список литературы*

1. Dhabhai R. Production and Applications of Artificial seeds: A Review / Dhabhai R., Prakash A // International Research Journal of Biological Sciences, 2012, Vol. 1 No. 5, 74-78 pp.
2. Hussain Ara. Synthetic seed: Prospects and limitations / Hussain Ara, Uma Jaiswal, V.S. Jaiswal // Current Science, 2000, Vol. 78 No. 12, 1438-1444 pp.
3. Rai M. K. The encapsulation technology in fruit plants – A review / Rai M. K., Asthana P., Singh S. K., Jaiswal V. S., Jaiswal U. // Biotechnology Advances, 2009, Vol. 27, 671-679 pp.

*При поддержке Фонда содействия инновациям, <http://fasie.ru>*

*Благодарность выражается научному руководителю, Сергееву Роману Владимировичу*

### **РОСТОСТИМУЛИРУЮЩИЙ ПОТЕНЦИАЛ И СОСТАВ ЭНДО- И ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ *BACILLUS TOYONENSIS ED-1***

Хакимуллина Г.И., Хабибрахманова В.Р.<sup>2</sup>, Карамова Н.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (89274823877, [gulnarochka1997@mail.ru](mailto:gulnarochka1997@mail.ru)),

Увеличение уровня продуктивности сельскохозяйственного производства является одной из важнейших проблем современности. Для сохранения плодородия почвы и предотвращения поступления в нее химических удобрений, в настоящее время разрабатываются комплексные меры по повышению урожайности экономически важных культур, в том числе, основанные на применении эффективных биопрепаратов на основе перспективных штаммов микроорганизмов [Сидоренко, 2012].

В связи с вышесказанным, целью нашей работы явилась оценка ростостимулирующего потенциала штамма эндофитных бактерий *Bacillus toyonensis* ED-1, выделенного из растений картофеля *Solanum tuberosa* сорта Регги [Джаббарова с соавт., 2017], а также качественный анализ и анализ экзо- и эндометаболитов исследуемого штамма.

**Материалы и методы.** Объектом исследования был штамм эндофитных бактерий *Bacillus toyonensis* ED-1. Оценку ростостимулирующей активности культуральной жидкости штамма *Bacillus toyonensis* ED-1 в разных разведениях проводили с использованием семян кресс-салата сорта «Забава» и гороха сорта «Кабан». Экстрагирование метаболитов осуществляли методом жидкость–жидкостной экстракции культуральной жидкости и гомогената клеток разными растворителями. Присутствие фитогормонов в исследуемых экстрактах оценивали с применением метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) (лабораторный комплекс САМАГ, Швейцария). В качестве стандартов веществ использованы синтетические фитогормоны: гиббереллин А3, кинетин, 6-бензиламинопуридин, гетероауксин ( $\alpha$ -индолилуксусная кислота), абсцизовая кислота Sigma-Aldrich (Германия) и Acros Organics (Бельгия). Хроматографирование осуществляли в системе растворителей изопропанол: аммиак. Дериватизацию пластин ТСХ проводили с использованием реактива Ван-Урка и 5 % раствора серной кислоты в этаноле с последующим нагреванием в сушильном шкафу при температуре 105°C в течение 10 мин и 160 °C в течение 30 мин. Денситометрическую обработку полученных хроматограмм проводили на приборе TLC Scanner 3 (САМАГ, Швейцария) с программным обеспечением «winCATS» в режиме адсорбции при 620 нм и 420 нм.

**Результаты и обсуждения.** Сравнительный анализ морфометрических параметров проростков и суммарной массы корешков и ростков растений, выросших из семян кресс-салата и гороха, обработанных минеральной смесью Кнопа (контроль) и культуральной жидкостью штамма *Bacillus toyonensis* ED-1, показал, что при действии разведения культуральной жидкости в разведении 1/10000 наблюдается наиболее интенсивный рост растений. Такие показатели, как средняя длина корня, средняя общая длина проростка, масса сухого остатка растений в опытном варианте значительно превышали данные для контроля.

Денситометрический анализ хроматограмм, полученных при ВЭТСХ анализе, показывает, что в ацетоновом экстракте гомогената клеток содержится 7 веществ, в этилацетатном экстракте культуральной жидкости – 18, в бутанольном экстракте – 13 веществ. На основе сопоставления данных хроматографического анализа экстракта культуральной жидкости *Bacillus toyonensis* ED-1 с  $R_f$  стандартов и литературными данными установлено, что данный штамм бактерия продуцирует различные метаболиты, среди них такие вещества как: DL-5-окситриптофан, 5-оксииндол-3-уксусная кислота, триптофан, антралиловая кислота, 3-оксиметилиндол, индол-3-ацетальдегид, гибберелин А3, DL-5-метилтриптофан,  $\beta$ -индол-3-пропионовая кислота,  $\gamma$ -индол-3-масляная кислота, индол-3-ацетонитрил, dl-кинуренин и грамин.

**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследованный нами штамм эндофитных бактерий растений картофеля сорта Регги обладает ростостимулирующим потенциалом в отношении растений гороха и кресс-салата и синтезирует различные эндо- и экзометаболиты, являющиеся предшественниками и производными индолил-3-уксусной кислоты, известного регулятора роста растений. Таким образом, штамм *Bacillus toyonensis* ED-1 является перспективным кандидатом для создания биопрепаратов, обладающих ростостимулирующим эффектом в отношении сельскохозяйственных культур.

### *Список литературы*

1. Сидоренко О.Д., Перспективы использования препаратов на микробиологической основе. Известия ТСХА. 2012; 6; 70-80.
2. Джаббарова Э.М., Эндофитные бактерии как потенциальная основа биопрепаратов для стимуляции роста растений / Э.М. Джаббарова, С.К. Гумерова, Н.С. Карамова, В.Р. Хабибрахманова // Химия и технология растительных веществ: тезисы докл. X Всеросс. научн. конфер. и школы молодых ученых, Казань, 5-9 июня 2017 г. / ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН - Казань, 2017; 163.

#### **Сведения об авторах:**

**Хакимуллина Г.И.**<sup>1</sup> – студент кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, 420008 Россия, г. Казань, Кремлёвская, 18, тел. +7(927)4823877 e-mail: , [gulnarochka1997@mail.ru](mailto:gulnarochka1997@mail.ru)

**Хабибрахманова В.Р.**<sup>2</sup> – доцент кафедры «Пищевой биотехнологии» Казанского национального исследовательского технологического университета, 420015, Россия, г. Казань, К. Маркса, 68.

**Карамова Н.С.**<sup>1</sup> – к.б.н., доцент кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, 420008 Россия, г. Казань, Кремлёвская, 18, тел.+7(843337884), e-mail: [nskaramova@mail.ru](mailto:nskaramova@mail.ru)

*Размышления о роли биохимии в  
современном мире*

Лауреаты конкурса  
лучшее эссе на тему  
«Биохимия – основа наук о Жизни»

*Среди студентов 1 и 2 курсов ИФМиБ КФУ*

Почему же биохимию считают основой наук о жизни? Насколько важно изучение химических процессов, происходящих в нашем организме ежесекундно? Как я вижу себя в этой науке? Именно на эти вопросы мне хотелось бы ответить, прежде всего, чтобы выяснить для самой себя дальнейшее развитие этой науки с точки зрения моей будущей деятельности?

Моя бабушка проработала лаборантом биохимического анализа 48 лет. Когда мне было лет шесть, мы с мамой пришли к бабушке на работу. Они с мамой ушли куда-то ненадолго. В это время я залезла на бабушкин стул и впервые в жизни посмотрела в микроскоп. Я никогда не забуду те ощущения, которые я испытала. В этот момент передо мной раскрылся новый мир, на предметном стекле происходили какие-то процессы, там тоже протекала своя жизнь, только на другом уровне. (Как оказалось - это были клетки крови эритроциты.) Интерес к изучению биохимических процессов не угасал и в школе. Познавая биосинтез белка, обмен веществ, фотосинтез мне было удивительно перенести всё это в мир, который я вижу невооруженным взглядом. Гуляя по парку, видеть прекрасные и могучие деревья, осознавать, что в данный момент в них протекает непрерывный процесс образования органических веществ, благодаря которому существуют не только они, но и всё человечество. Царства живой природы от простейших и до огромного кита, весящего несколько тонн, существуют благодаря единому процессу биосинтеза белка. Поэтому ученые и определяют жизнь, как бесконечную сумму согласованных, медленно протекающих химических реакций. Не согласиться с этим трудно. Ведь от процесса, длящегося несколько секунд, зависит жизнь и состояние всей биологической системы в целом. А биохимия является переходом от «мёртвых» молекул к структурам, способным делиться и размножаться. Поэтому именно эта наука и является основополагающей в изучении жизни с биологической точки зрения.

С момента образования первой клетки организма (зиготы) уже начинается бесконечный химический процесс и заканчивается он только тогда, когда система начинает умирать. В этот момент также происходят химические реакции, точнее происходят изменения в этих реакциях (нарушение синтеза АТФ, ионных градиентов, образование свободных радикалов, повышается проницаемость клеточных мембран). Причинами изменений могут быть различные патологии: непереносимость к каким-либо веществам, недостаток жизненно важных элементов в организме и т.п. Найти причину возникновения этих патологий на молекулярном уровне, исследовать как те или иные препараты воздействуют на клетки – одна из многих задач биохимии. Эта наука также изучает белки, в результате которых возникают мутации клеток, их неконтролируемое деление, приводящее к смертельному заболеванию – раку, победить который человечеству пока не удаётся; специфика ферментов, их роль в той или иной реакции, а также механизм действия ферментативной реакции. Биохимия дала начало многим методам исследования клетки: центрифугированию, хроматографии, также был открыт электрофорез. Биохимия в совокупности с генетикой и геной инженерией, конструирует генно-изменённые организмы для получения новых веществ нужных, к примеру, для метаболизма (ярким примером может стать инсулин, вырабатываемый генно - модифицированными микроорганизмами, для людей болеющих диабетом).

Биохимия является важным компонентом практической деятельности человека (сельское хозяйство, пищевая промышленность и т.д.). Например, фермент казеин использовался для створаживания молока, сейчас он находит применение и в медицине. Другими словами, обобщая всё выше сказанное, можно сделать вывод: биохимия является важнейшей наукой в сфере человеческой деятельности, она охватывает и рождает другие не менее важные отрасли наук. Без неё невозможно представить будущее развитие да и как его представить, не зная что прямо сейчас ,в данную минуту и секунду происходит внутри тебя. Возможно ли представить фармакологию без экспериментов, проводимых биохимиками в лаборатории? Думаю, нет.

Биохимия, и в целом биология, не стоят на месте, например в то время ,когда начинала работать моя бабушка ,ничего ещё ничего не было известно о ДНК , толком не были изучены процессы транскрипции и трансляции. А сегодня эти темы освещаются в школьных учебниках. Также создаются новые технологии , компьютерные программы и т.п. Поэтому думать, что биохимик пользуется лишь пробирками и колбами ошибочно. Такой мощной скачок в области биохимии ещё раз подтверждает её значимость и будущие перспективы. Мой же интерес к этой науке возростал постепенно, с началом уроков химии, в особенности органической, когда преподаватель часто затрагивал темы связанные с биологией. И мои знания подкреплялись химическими основами строения веществ, входящих в состав клетки, (например, почему клеточная стенка растений очень прочная, это связано со строением самой молекулы целлюлозы и тут на помощь приходят знания химии). Поэтому биохимия для меня, будучи самостоятельной наукой родилась благодаря химии и биологии, двум дисциплинам интересующим меня во всех направлениях. Говорить о том, что они даются мне легко, я думаю не правильным, а если говорить искренне, иногда бывает трудно, что-то не получается, что-то ты не можешь уложить в своей голове , но безграничный интерес, желание изучать ,открывать и наблюдать всё это, если так можно выразиться, мне присуще. И в будущем мне хотелось бы изучать природу образования раковых клеток с точки зрения биохимии. Что происходит в клетке, почему она «ломается» и начинает бесконтрольно делиться? Каковы внутренние молекулярные механизмы рака? Почему организм сам помогает раковой опухоли увеличиваться, и какие вещества участвуют в этом процессе?

Возможно, ли это предотвратить? ( Данная болезнь, к сожалению, коснулась и моей семьи, поэтому это также можно считать причиной возникновения интереса к «эпидемии» 20-21 в.).

Не менее интересным для меня является и разработка препаратов, их влияние на организм, а также наблюдение ферментативных реакций клетки.

Итак, подводя итоги моего рассуждения, хочется процитировать слова Фридриха Энгельса: «Жизнь - есть способ существования белковых тел, существенным моментом которого является постоянный обмен веществ с окружающей их внешней средой, причем с прекращением этого обмена веществ прекращается и жизнь, что приводит к разложению белка». Эти слова подтверждают тот факт, что всё рождается в результате химической реакции, существует благодаря постоянным химическим реакциям и умирает также благодаря химическим реакциям.

Молекулы и химические вещества есть фундамент, на котором построена жизнь, благодаря которому существует наша цивилизация, и для того чтобы она процветала и продолжала существовать, важно понимать структуру её строения.

Любовь к естественным наукам пришла ко мне не так давно, но я всегда чувствовала это единение с миром. Мне нравится наблюдать за тем, что происходит вокруг меня, даже если это просто колышущиеся ветви деревьев на ветру.

На одном из этапов моей жизни, мне приходилось часто переезжать из одного города в другой. Пейзаж сменялся один за другим, и это дало пищу для моих размышлений. Я видела многое: невероятную красоту моей родной области, за которой я могу наблюдать часами напролет, и голые поля, опустевшие после страшных летних пожаров. Когда я вижу подобное, в моем сердце словно что-то сжимается, в голове складываются картинки, и я снова и снова убеждаюсь, что в жизни намного больше черных полос, чем мы думаем.

Земля не только для нас, большой урон получает все живое в мире. Страшно представить сколько животных страдает от рук человека, от его необдуманных поступков. Огромное количество животных в год убивают ради пищи, охотники истребляют обитателей леса ради трофеев и дорогих натуральных шкур. Ведь человек может жить и без этого, не правда ли? Но если бы виноваты были только мы... Проблема кроется намного глубже. Стихийные бедствия, влияние космоса на Землю, ультрафиолетовые лучи, химия и многое другое... Сколько опасностей поджидает живых существ, и сколько всего неизведанного может быть в мире... Что еще может ломать жизни миллиардов людей?

Эти мысли пробудили во мне интерес к биологии. Я хочу узнать, как устроено все живое, как они живут и взаимодействуют друг с другом. Именно это желание и привело меня на биологическое направление в Казанский федеральный университет.

Среди всех остальных направлений я считаю свое лучшим, потому что люди, окружающие меня на потоке, решили связать свою жизнь с биологией, они сделали осознанный выбор. Ученые не гонятся за деньгами, они любят свою работу, их действительно интересует живой мир, и они хотят вложить какой-нибудь вклад для улучшения жизни на нашей планете.

Чтобы повысить качество жизни на Земле сперва нужно узнать многое об устройстве нашего организма. Удивительно, как много мы не знаем о собственном теле. Я думаю, что знания в этой области очень помогли бы нам во многом. Например, мы бы смогли предупредить многие болезни, а вследствие, и избежать множества смертей. Если бы люди понимали, как они устроены, знали особенности своего тела, мы бы намного реже страдали от различных заболеваний. Чтобы прийти к решению этой проблемы, необходимо досконально изучить физиологию клеток нашего организма, узнать, как они взаимодействуют с инородными организмами и веществами, как влияют гормоны на наше тело. Удивительно, как мы устроены! И для каждого из нас нужен индивидуальный подход.

Чтобы осуществить задуманное, нужно обратиться к такой науке как биохимия. Биохимия – это сравнительно молодая наука, которая находится на стыке химии и биологии. Она изучает химический состав живых клеток и организмов, а также дает понятие о природе химических реакций, происходящих в процессах жизнедеятельности.

Я думаю, что данное направление будет перспективным еще многие поколения, потому что проблема болезней остро стоит в наши дни. Ученые изучают раковые клетки, проводят исследования и приходят к выводам, какие вещества как действуют на опухоли. Многие естествоиспытатели изучают окружающий нас мир, ищут объяснения целебным свойствам



лекарственных растений, синтезируют различные сложные соединения, которые смогли бы участвовать в борьбе со смертельными болезнями и смогли бы убить раковые клетки раз и навсегда.

Сейчас я учусь на первом курсе, и мы проходим базовые, необходимые для дальнейшего изучения науки, вещи. Уже через год я смогу выбрать профиль биохимии и развиваться в этом направлении. Я действительно стремлюсь к познанию этой науки, ведь будучи человеком, я практически ничего не знаю о себе. Например, из чего состоит мое тело, какие процессы жизнедеятельности происходят в моем организме на молекулярном уровне. Тело многоклеточного организма, а в особенности любого крупного животного, представляет собой мегаполис, в котором клетки-это его жители. Они работают, воспроизводят и умирают, как и все живое на нашей планете. Клетки тела взаимодействуют между собой, образуя целую систему органов, образуя сложный самостоятельный организм. Кроме этого, в каждом теле есть чужеродные субстраты, растворы минеральных веществ и гормоны. Они образуют так называемую окружающую среду для наших клеток. Жители мегаполиса подвергаются к различным воздействиям, и в зависимости от концентрации этих веществ, от силы их воздействия друг на друга, организм получает положительный или отрицательный ответ.

Биохимия-удивительная наука. Чего только стоит работа гормонов в человеческом теле! За работу всей гормональной системы в нашем организме отвечает гипоталамус-это участок мозга весом меньше двухрублевой монеты. А самая важная эндокринная железа-гипофиз весит всего около 1 грамма! Гормоны оказывают огромное влияние на наше физиологическое и моральное состояние. Например, мужской гормон-тестостерон, работая в норме, приводит к укреплению тела и формированию низкого голоса, кроме этого он оказывает влияние на характер. У человека развивается уверенность в себе, хорошая реакция и сила духа. При этом тело и психика человека уже не смогут вести себя иначе. Соппротивление бесполезно! Самыми интересными гормонами для меня являются окситоцин и серотонин. Первый-гормон привязанности, он отвечает за материнские чувства женщины и влюбленность людей, вне зависимости от половой принадлежности. Второй-гормон счастья. Разве не удивительно, как меняют внутреннее состояние человека всего лишь 2 маленьких гормона? А их в организме намного больше!

Менее радужно обстоят дела с онкологией. Раковые клетки быстро и бесконтрольно растут и делятся независимо от того, из какого типа ткани они возникли. Опухолевые клетки разрушают ткани и нарушают работу всего организма, что приводит к летальному исходу. Не всегда человек виноват в развитии у него данной болезни. Раковые клетки есть у всех людей, но они находятся в пассивном состоянии, а для того, чтобы их «разбудить» достаточно изменения условий внешней среды. Зачастую люди узнают о своих недугах слишком поздно, когда опухоли становятся неоперабельными. Поэтому для человечества так важно научиться бороться с опухолевыми образованиями безболезненно, научиться убивать смертоносные клетки раз и навсегда, изучать их химический состав и делать их безобидными для человеческого организма, узнавать генетическую предрасположенность к онкологическим заболеваниям.

До 21 века человечество научилось многому. Появилось множество техники, которая здорово облегчает нам жизнь. Развитые страны перестали при каждом возможном поводе развязывать войну, лидеры находят компромиссы, заключают взаимовыгодный договор. В настоящее время человечеству необходимо повысить качество своей жизни. А что может

помочь достичь этого лучше, чем биохимия? Именно поэтому в развитых странах с каждым годом естественные науки получают все большую популярность.

Только за последние два века человечество большими шагами освоило промышленную отрасль, благодаря чему наша планета сильно пострадала: большая часть лесов вырублена, атмосферный воздух сильно загрязнен, большое количество животных и растительных видов оказалось под угрозой вымирания. Количество серьезных заболеваний не уменьшается, поэтому направление биохимии долгие годы, а может быть и столетия будет актуальным для нас.

Я хочу узнать как можно больше о биохимическом составе всего живого. Ведь так интересно узнавать что-то новое. А биология-это именно та наука, которая развивается все больше и больше с каждым днем маленькими шажками. Невозможно знать абсолютно все. Я постоянно удивляюсь тому, насколько этот мир многогранен. Даже, казалось бы, самые простейшие живые организмы... но даже они так сложно устроены! Каждый вид имеет характерные только для них особенности, в каждом происходят особенные процессы, а про сложную генетическую систему и говорить нечего...

Узнав много нового для себя в университете, я поделюсь интересными фактами о живом, об организме человека со своими близкими и друзьями. Я считаю, что каждому человеку важно находиться в гармонии со своим телом и окружающим миром. Поэтому нужно знать о своем теле как можно больше и заботится о нашей планете.