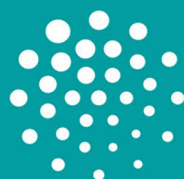




ФЕДЕРАЛЬНАЯ
ТЕРРИТОРИЯ
«СИРИУС»



Сириус
Научно-технологический
университет

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ

Саммита разработчиков
лекарственных средств
«Сириус.Биотех»,
Форума генетических технологий
«Сириус.Техногенетика»

2025



СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ

Саммита разработчиков
лекарственных средств
«Сириус.Биотех»
Форума генетических технологий
«Сириус.Техногенетика»

Москва
Альпен-Принт
2025

УДК 615:577.21:001.891
ББК 52.8
С23

Под общей редакцией:

Иванова Романа Алексеевича, PhD, директора Научного центра трансляционной медицины, председателя Учёного совета АНОО ВО «Университет «Сириус»;

Сазонова Алексея Эдуардовича, д.м.н., исполнительного директора Научного центра генетики и наук о жизни АНОО ВО «Университет «Сириус».

Рецензенты:

Щекотихин Андрей Егорович, профессор РАН, д.х.н., доцент, директор ФГБНУ "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе"

Патрушев Максим Владимирович, к.б.н., Заместитель директора по биологии и генетике, НИЦ «Курчатовский институт»

С23 Сборник материалов Саммита разработчиков лекарственных средств «Сириус.Биотех» и Форума генетических технологий «Сириус.Техногенетика» /
под общ. ред. Р. А. Иванова, А. Э. Сазонова. -
Москва : ООО «Альпен-Принт», 2025. - 312 с. : ил., табл.

ISBN 978-5-6055294-6-0

DOI: 10.65551/978-5-6055294-6-0.2025

EDN: KKQJQE

© НТУ Сириус, 2025
© ООО «Альпен-Принт», 2025

БИОТЕХ 2025

Саммит разработчиков лекарственных препаратов «Сириус.Биотех» проводится на Федеральной территории «Сириус» с 2023 года. Организатором мероприятия выступает Научно-технологический университет «Сириус».

Ежегодно в Саммите принимают участие представители университетов, академических институтов и высокотехнологичных компаний, вовлеченных в разработку новых лекарств, а также студенты и молодые ученые.

В 2025 году мероприятие собрало более 1500 участников: именитых учёных, представителей государственных структур и регуляторов рынка лекарственных средств, амбассадоров фармацевтических компаний и молодых исследователей. В числе спикеров были эксперты ведущих фармацевтических компаний страны, среди которых — «Р-Фарм», «Генериум», «Химрар», «Биокад», «Валента Фарм», «Развитие Биотехнологий», и «Герофарм», крупнейшие поставщики оборудования и материалов «Химмед», «Хеликон», «Eminence», «Альгимед», «Лакопа», «СкайДжин», «Биосан» и «Биолабмикс», а также ведущих научно-исследовательских центров — НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи, НМИЦ имени В.А. Алмазова, Институт иммунологии ФМБА России, Сеченовский университет, НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева и многие другие. Эксперты поделились своими наработками, результатами исследований и проектов и лучшими образовательными практиками в сфере биомедицины. Молодые исследователи, студенты и аспиранты представили свои проекты экспертам из индустрии в рамках постерной сессии. Начинающие ученые смогли получить обратную связь от индустриальных партнеров и советы, как сделать свои проекты востребованными для рынка.

«Сириус.Биотех» — это площадка для обмена опытом, поиска партнеров, коллег, инвесторов и лицензиатов для разрабатываемых продуктов, возможность обсудить конкретные научные проблемы и технологические аспекты разработки лекарственных препаратов, создать партнерские связи. На Саммите ведущие эксперты отрасли рассказывают об основных технологических платформах разработки и производства лекарственных препаратов, трендах в индустрии, представят проекты своих команд. Саммит обеспечивает не только получение новых знаний, но и возможность прямого контакта с потенциальными работодателями, партнерами, коллабораторами. У участников есть возможность пообщаться с экспертами отраслевых компаний.

**ПОЛУЧЕНИЕ PSCA-CAR-NK-КЛЕТОК И АНАЛИЗ ИХ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НА 2D КУЛЬТУРАХ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ АНТИГЕННОЙ
ЭКСПРЕССИИ**

Вавилова Ю.Д., Величинский Р.А., Стрельцова М.А., Коваленко Е.И.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова Российской академии наук

e-mail: juliateterina12@gmail.com

**OBTAINING PSCA-CAR-NK CELLS AND ANALYSIS OF THEIR
FUNCTIONAL ACTIVITY ON 2D TUMOR CELL CULTURES WITH
DIFFERENT LEVELS OF ANTIGEN EXPRESSION**

Vavilova J.D., Velichinskii R.A., Streltsova M.A., Kovalenko E.I.

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry

Цель: получить генномодифицированные NK-клетки, специфические к антигену стволовых клеток простаты (PSCA) и охарактеризовать их цитотоксические свойства на 2D культуре опухолевых клеток с различным уровнем антигенной экспрессии.

Актуальность: CAR-NK-клетки имеют ряд преимуществ перед CAR-T-клетками из-за возможности использования аллогенных эффекторов и меньшего риска развития реакции «трансплантат против хозяина». Благодаря наличию на поверхности активирующих рецепторов NK-клетки распознают опухоль даже при потере экспрессии специфических антигенов. Тем не менее, распознавание опухолевых клеток с низким уровнем экспрессии таргетного антигена остается пока нерешенной проблемой в противоопухолевой терапии на основе CAR-лимфоцитов.

Методы: для доставки трансгена PSCA-CAR в NK-клетки человека использовался ретровирусный вектор, псевдотипированный оболочечным

белком эндогенного ретровируса RD114. NK-клетки были предварительно активированы растворимым IL-2 в сочетании с облученными фидерными клетками K562, экспрессирующим мембраносвязанный IL-21. Функциональная активность CAR-PSCA-NK-клеток после взаимодействия с клетками-мишенями HEK с разным уровнем экспрессии PSCA (HEK-PSCA^{high} и HEK-PSCA^{low}) оценивалась методом проточной цитометрии по уровню поверхностной экспрессии лизосомального маркера LAMP-1 (CD107a) и внутриклеточному содержанию гранзима В (GrB).

Результаты: получены PSCA-CAR-NK-клетки человека, эффективность трансдукции по уровню репортерного белка GFP достигала 23%. Уровень поверхностной экспрессии CD107a был повышен у GFP⁺ PSCA-CAR-NK-клеток по сравнению с GFP-негативными не зависимо от экспрессии таргетного антигена. Внутриклеточный уровень GrB был увеличен у GFP⁺ PSCA-CAR-NK-клеток только в ответ на инкубацию с клетками-мишенями, имеющими высокий уровень экспрессии PSCA.

Выводы: эти результаты подчеркивают потенциальную активность и специфичность PSCA-CAR-NK-клеток в отношении опухолевых клеток, высоко-экспрессирующих PSCA, что может иметь важное значение для дальнейших исследований в области клеточной терапии онкологических заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-75-00160).

**РАЗРАБОТКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ГЕЛЯ НА ОСНОВЕ
ЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАНЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ,
ВЫЗВАННЫХ БАКТЕРИЯМИ С ЛЕКАРСТВЕННОЙ
УСТОЙЧИВОСТЬЮ**

Васина Д.В.¹, Антонова Н.П.², Гущин В.А.²

¹ *Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, лаборатория энзимологии*

² *Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, лаборатория механизмов
популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов*

e-mail: d.v.vasina@gmail.com

**DEVELOPMENT OF ANTIBACTERIAL GEL WITH LYTIC ENZYMES
FOR THE TREATMENT OF WOUND INFECTIONS CAUSED BY DRUG-
RESISTANT BACTERIA**

Vasina D.V., Antonova N.P., Gushchin V.A.

N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology

Распространение среди бактерий устойчивости к антимикробным препаратам вызывает серьезную обеспокоенность медицинского сообщества уже не первое десятилетие [1]. В настоящее время активно развивающимся, перспективным и инновационным классом антибактериальных средств являются энзибиотики, к которым относятся литические ферменты бактериофагов (эндолизины) и бактерий (бактериоцины), а также, в широком смысле, деполимеразы бактериальных капсул/матрикса биопленок [2].

Литические ферменты, в основном, это пептидогликан-гидролазы различной природы, вызывают прямой лизис бактерий за счет разрушения клеточной стенки. Они обладают рядом преимуществ перед другими антибактериальными агентами за счет скорости и спектра действия, активности в отношении антибиотикоустойчивых бактерий, низкой вероятности нежелательных реакций в ответ на применение, а также способности разрушать

бактериальные биопленки, на которые плохо действуют классические низкомолекулярные антибактериальные средства [3]. В рамках данной работы использованы преимущества литических ферментов и их модифицированных производных для разработки противомикробного лекарственного средства с инновационным механизмом действия для терапии местных инфекций кожи и мягких тканей, вызванных бактериями, обладающими множественной лекарственной устойчивостью к агентам стандартной химиотерапии.

В ходе исследования было создано 16 генетических конструкций для рекомбинантной экспрессии и получена панель рекомбинантных литических ферментов фагов и бактерий, относящиеся к различным группам ферментов, включая лизоцим-подобные гликозидгидролазы, литические трансгликозилазы, эндопептидазы, литические амидазы. Часть ферментов обладает активностью в отношении грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и энтеробактерии), часть – в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* и *S. haemolyticus*).

Были определены эффективные концентрации и изучена противобиопленочная активность ферментов, их биотехнологические свойства (рН и термооптимум), а также безопасность *in vitro* (цитотоксичность, гемолитическое действие, формирование резистентности у бактерий). На основе полученных данных выбран эндолизин бактериофага (N-ацетилмурамидаза семейства GH24), активный в отношении грамотрицательных бактерий, и бактериальная эндопептидаза (семейство M23), активная в отношении грамположительных бактерий. Первый фермент был дополнительно модифицирован катионным антимикробным пептидом с получением инженерного лизина GRC-ML07, что позволило снизить эффективные бактерицидные дозы, повысить скорость действия, сохранить высокую бактерицидную активность в различных условиях среды, а также расширить спектр чувствительных видов.

Комбинирование двух ферментов, обладающих различной субстратной специфичностью, в условиях *in vitro* показало, что они проявляют

синергетический эффект в отношении *S. aureus* (как в отношении планктонных клеток, так их сформированных биопленок) и не потенцируют действие друг друга в отношении грамотрицательных бактерий. Данная комбинация была включена в состав готовой лекарственной формы для наружного применения, для которой также была проведена фармацевтическая разработка состава на основе скрининга фармацевтически приемлемых носителей и вспомогательных веществ.

Также была проведена сравнительная оценка эффективности отобранных кандидатных составов на модели полимикробной раневой инфекции у мышей, вызванной *S. aureus* (MRSA) и *P. aeruginosa* (CRPA). Сравнение эффективности гелей показало, что наилучшими ранозаживляющими и антибактериальными характеристиками обладает состав, включающий в себя карбоксиметилцеллюлозу и альгинат натрия в качестве гелеобразующих веществ. Он способствует выраженному и быстрому заживлению раневых дефектов, особенно в первой фазе раневого процесса на 3-7 сутки, наиболее эффективно предотвращает проникновение бактерий в кровоток, и позволяет добиться полной элиминации бактерий обоих видов (золотистый стафилококк и синегнойная палочка) из области раневого дефекта к 14 суткам.

Таким образом, в ходе исследования был разработан антибактериальный гель для наружного применения, который представляет собой инновационное биотехнологическое лекарственное средство-энзибиотик на основе бактериолитических ферментов для лечения раневых, ожоговых или ассоциированных с хирургическими манипуляциями инфекций, вызванных полимикробными консорциумами, обладающими лекарственной устойчивостью к агентам стандартной химиотерапии.

Работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения РФ (государственное задание №124013100861-3 и №125021101874-6).

Литература:

1. Naghavi M. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–

2021: a systematic analysis with forecasts to 2050 // The Lancet. Elsevier, 2024. Vol. 404, № 10459. P. 1199–1226.

2. Heselpoth R.D. et al. Enzybiotics: Endolysins and Bacteriocins // Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy, Volume 2. Springer International Publishing, 2021. P. 989–1030.

3. Danis-Wlodarczyk K.M., Wozniak D.J., Abedon S.T. Treating Bacterial Infections with Bacteriophage-Based Enzybiotics: In Vitro, In Vivo and Clinical Application // Antibiotics (Basel). Antibiotics (Basel), 2021. Vol. 10, № 12.

ИСКУССТВЕННЫЕ ВЕЗИКУЛЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ АЛЛОГЕННЫХ TREG-КЛЕТОК: ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Ганеева И.А.¹, Змиевская Е.А.¹, Некторова М.Е.¹, Булатов Э.Р.^{1,2}

¹ – ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет",

Институт Фундаментальной медицины и биологии

² – ФГБУН ГНЦ Институт биоорганической химии им. академиков М.М.

Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Лаборатория белков гормональной регуляции

e-mail: kovirka1995@gmail.com

ARTIFICIAL VESICLES DERIVATED FROM ALLOGENEIC TREG CELLS: A PROMISING METHOD FOR THE TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS

Ganeeva I.A.¹, Zmievskaya E.A.¹, Nektorova M.E.¹, Bulatov E.R.^{1,2}

¹ – Kazan (Volga region) Federal University

² – Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian

Academy of Sciences

Цель: Оценить иммуносупрессорное воздействие микровезикул из индуцированных Т-регуляторных клеток (Treg) на мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

Актуальность: Рассеянный склероз (РС) – хроническое аутоиммунное заболевание ЦНС. $CD4^+CD25^{hi}$ Treg, регулирующие иммунный ответ, при РС дисфункциональны. Внеклеточные везикулы (ВВ), полученные из Treg, несут иммунорегуляторные белки и микроРНК, которые модулируют активность Т-клеток. Однако ВВ от пациентов с РС демонстрируют сниженную подавляющую способность, что позволяет предположить, что их дисфункция способствует патогенезу РС.

Методы: Treg дифференцировали из наивных Т-клеток здоровых доноров, проводили нокдаун HLA класса I (B2M-shRNA). ВВ, включая естественные везикулы, искусственные везикулы, индуцированные цитохалазином В, и искусственные везикулы, индуцированные ультразвуком, были выделены из Tregs и охарактеризованы с помощью сканирующей электронной микроскопии, анализа траектории наночастиц, проточной цитометрии и вестерн-блоттинга. Их влияние на МКПК здоровых доноров и МКПК пациентов с РС оценивали методом проточной цитометрии и ИФА (IL-6, IL-10, IFN- γ).

Результаты: Ультразвуковая обработка показала бóльший количественный выход ВВ, обогащенных ключевыми иммуносупрессивными белками, включая PD-1 и Tim-3, по сравнению с цитохалазином В. Функциональные анализы продемонстрировали способность ВВ, индуцированных ультразвуком, подавлять воспалительные маркеры, такие как IFN γ , и модулировать профиль цитокинов как при воздействии на МКПК здоровых доноров, так и на МКПК, полученных от пациентов с РС.

Заключение: Разработка эффективных методов лечения РС остается сложной задачей. В то время как клеточная терапия сталкивается с ограничениями, такими как дисфункция Treg и проблемы с доставкой в ЦНС, аллогенные ВВ предлагают многообещающую альтернативу благодаря своей масштабируемости, низкой иммуногенности и проникновению через гематоэнцефалический барьер. Искусственные ВВ сохраняют иммуносупрессорные свойства и модулируют МКПК, что делает их перспективной альтернативой. Необходимы дальнейшие исследования для

оптимизации производства и подтверждения эффективности в моделях заболеваний.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной КФУ для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект № FZSM-2022-0016). Авторы выражают благодарность Петухову Алексею Вячеславовичу за дизайн shRNA и предоставленный плазмидный конструктор.

**РАЗРАБОТКА ХИМЕРНЫХ ЭНДОЛИЗИНОВ ПРОТИВ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОДХОДА
КОМБИНИРОВАНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ И УЗНАЮЩИХ ДОМЕНОВ**

Гасина М.И.¹, Загоскин А.А.¹, Нагорных М.О.¹

*¹АНОО ВО Научно-технологический университет «Сириус», научный центр
генетики и наук о жизни*

e-mail: mariya.gasina@yandex.ru

**DEVELOPMENT OF CHIMERIC ENDOLYSINS AGAINST
STAPHYLOCOCCUS AUREUS USING THE APPROACH OF COMBINING
CATALYTIC AND RECOGNITION DOMAINS**

Gasina M.I.¹, Zagoskin A.A.¹, Nagornyykh M.O.¹

*¹Sirius University of Science and Technology, Scientific Center for Genetics and Life
Sciences*

Рост антибиотикорезистентности бактерий, включая *Staphylococcus aureus*, стимулирует поиск альтернативных стратегий борьбы с инфекциями, среди которых особый интерес представляют фаговые эндолизины [1]. Однако разработка высокоактивных эндолизинотерапевтических препаратов сопряжена с рядом трудностей, включая необходимость получения растворимых форм с выраженной каталитической активностью [2]. Перспективным подходом в этой области может стать конструирование новых вариантов эндолизинотерапевтических препаратов за счёт перестановки функциональных доменов, что особенно актуально для модульных структур, характерных для эндолизинотерапевтических препаратов грамположительных бактерий.

Целью исследования являлось создание химерных эндолизинов, путём комбинирования каталитических доменов и узнающих доменов, специфичных к *S. aureus*.

На основе нуклеотидных и аминокислотных последовательностей природных эндолизинов (NCBI, UniProt) проектировались химерные конструкции методом доменного шаффлинга с амплификацией и слиянием фрагментов посредством сплайс- ПЦР. Полученные последовательности клонировали в составе экспрессионной плазмиды pET-21, конструкции проверяли секвенированием по Сэнгеру. Экспрессию химерных белков индуцировали в *E. coli* при добавлении ИПТГ (и L-рамнозы для KRX), далее проводили ультразвуковой лизис клеток и очистку белков аффинной хроматографией на Ni-NTA. Чистоту оценивали с помощью SDS-PAGE. Антибактериальную активность против *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 исследовали по снижению КОЕ, используя следующую формулу:

$$X = 100 - ((\text{КОЕ образца} * 100) / \text{КОЕ контроля}), \text{ где}$$

X — антибактериальная активность исследуемого белка, выраженная в %;

КОЕ образца — количество колониеобразующих единиц на чашке после инкубирования клеток с исследуемым белком;

КОЕ контроля — количество колониеобразующих единиц на чашке без обработки исследуемым белком.

В результате работы были сконструированы четыре химерных эндолизина: MSPM, MSlysPM, CplPM и PalPM. Каждый из них включал каталитический домен, объединённый с узнающим доменом PM9. Особый интерес представляет конструкция MSlysPM, содержащая два узнающих домена: первый специфичен к *Streptococcus pneumoniae*, а второй — к *Staphylococcus aureus*, что теоретически должно расширять спектр действия данного белка.

По результатам оценки антибактериальной активности наибольшую эффективность показал эндолизин MSPM, обеспечивший до 92% лизиса клеток *S. aureus*. Остальные конструкции проявили более низкий уровень активности (рисунок 1)

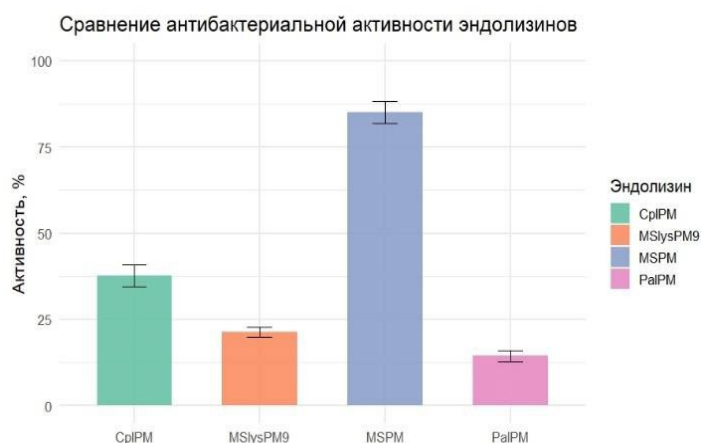


Рисунок 1 - Сравнение антибактериальной активности химерных эндолизинов

Кроме того, было установлено, что при добавлении яблочной кислоты, способствующей повышению проницаемости клеточной стенки и, соответственно, доступности субстрата для фермента, антибактериальный эффект усиливался для эндолизина MSPM, достигая 95% (рисунок 2).

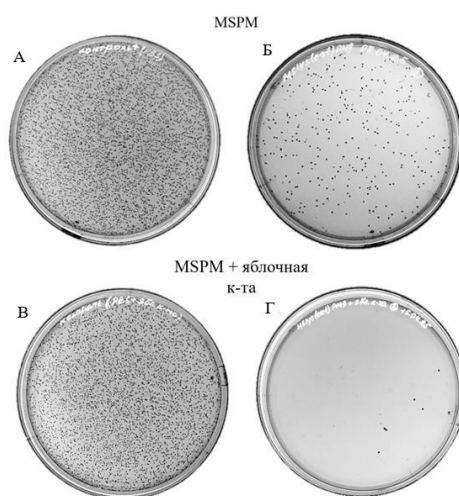


Рисунок 2 - Проверка антибактериальной активности эндолизина MSPM

*A – контроль (*S. aureus* + PBS)*

*Б – *S. aureus* после инкубирования с белком MSPM*

*В - контроль (*S. aureus* + PBS + 5mM яблочная кислота)*

*Г – *S. aureus* после инкубирования с белком MSPM и 5mM яблочной кислотой*

В результате работы были созданы химерные эндолизины, специфически узнающие *S. aureus*, среди которых MSPM показал наибольшую

антибактериальную активность (92%), усиленную до 95% при добавлении яблочной кислоты, что демонстрирует перспективность использования метода доменного шаффлинга для разработки химерных эндолизин в качестве альтернативы антибиотикам.

Литература:

1. Endolysins: a new antimicrobial agent against antimicrobial resistance. Strategies and opportunities in overcoming the challenges of endolysins against Gram-negative bacteria / F. M. Khan, F. Rasheed, Y. Yang [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2024. – Vol. 15. – Endolysins. – P. 1385261.
2. Therapeutic potential of bacteriophage endolysins for infections caused by Gram-positive bacteria / H. Liu, Z. Hu, M. Li [et al.] // *Journal of Biomedical Science*. – 2023. – Vol. 30. – № 1. – P. 29.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ МУЛЬТИВАЛЕНТНЫЕ АНТИТЕЛА НА ОСНОВЕ VHH, НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ ШИРОКИЙ СПЕКТР ВАРИАНТОВ SARS-COV-2¹

Десюкевич П.Ю., Солодков П.П., Беловежец Т.Н., Чикаев А.Н.

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

RECOMBINANT MULTIVALENT VHH-BASED ANTIBODIES THAT NEUTRALIZE A WIDE RANGE OF SARS-COV-2 VARIANTS

Desyukevich P.Yu., Solodkov P.P., Belovezhets T.N., Chikaev A.N.

*Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian
Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

Несмотря на окончание пандемии COVID-19 и отсутствие высоких рисков для подавляющего большинства населения, коронавирусная инфекция всё ещё представляет угрозу для групп людей, не способных сформировать собственный

¹ Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ Соглашение 075-15-2021-1086, контракт №. РФ----193021X0015, 15.ИП.21.0015.

иммунный ответ. Высокая генетическая изменчивость SARS-CoV-2, в свою очередь, приводит к появлению новых вариантов вируса, склонных к мутационному ускользанию от большинства авторизованных моноклональных антител. Одним из способов противодействия данному эффекту является использование биспецифических антител (bsAbs), одновременно связывающих различные группы эпитопов на поверхности антигена, тем самым минимизируя вероятность мутационного ускользания вируса. В последнее время в качестве основы для создания bsAbs набирает популярность платформа наноантител (VHH) [1]. VHH – это переменные домены тяжёлых цепей однодоменных антител камелид, способные связываться с антигеном так же эффективно, как и традиционные молекулы IgG, но при этом обладающие высокой стабильностью, относительно простым строением и малыми размерами (~15 кДа), что обеспечивает низкую иммуногенность, а также удобство для генно-инженерных манипуляций и сниженную стоимость производства.

В данной работе мы сконструировали панель биспецифических антител на основе клонов VHH (A7, A57, A58, A80), способных нейтрализовать различные варианты SARS-CoV-2 путём распознавания неперекрывающихся участков рецептор-связывающего домена (RBD) S-белка коронавируса [2]. Панель состояла из димеров вида VHH_i-VHH_j, в которых субъединицы VHH соединялись пептидными линкерами различной длины и жёсткости. Полученные bsAbs эффективно нейтрализовали устойчивые сублинии SARS-CoV-2, такие как JN.1 и KP.2. В частности, среди разработанных bsAbs димер A57-GS18²-A7 показал наилучшую активность, нейтрализовав вариант EG.5, резистентный к большинству существующих сегодня антител. Таким образом, разработанные антитела обладают высокими протективными свойствами, а их биспецифичность будет способствовать сохранению эффективности при появлении новых вариантов вируса.

² GS18 – глицин-сериновый линкер, состоящий из 18 аминокислотных остатков.

Литература:

1. Yang M.L. et al. A VHH single-domain platform enabling discovery and development of monospecific antibodies and modular neutralizing bispecifics against SARS-CoV-2 variants // *Antib Ther.* 2024. Vol. 7, № 2. P. 164–176.
2. Solodkov P.P. et al. Serial Llama Immunization with Various SARS-CoV-2 RBD Variants Induces Broad Spectrum Virus-Neutralizing Nanobodies // *Vaccines (Basel).* 2024. Vol. 12, № 2. P. 129.

ДНК-АПТАМЕРЫ В ТЕРАНОСТИКЕ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Завьялова Е.Г.¹, Нечаев А.Н.²

¹*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет*

²*Объединенный институт ядерных исследований
e-mail: zlenka2006@gmail.com*

DNA APTAMERS IN THERANOSTICS OF VIRAL DISEASES

Zavyalova E.G.¹, Nechaev A.N.

¹*Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department*

²*Joint Institute for Nuclear Research*

Аптамеры – структурированные олигонуклеотиды, способные к специфическому связыванию аналитов. Константы диссоциации комплексов аптамер-белок находятся в диапазоне от 1 пкМ до 10 нМ, что сопоставимо с аффинностью антител. В отличие от других узнающих элементов, аптамеры можно разработать к аналиту любой химической природы, включая катионы металлов, органические молекулы, белки. Аптамеры получают автоматическим химическим синтезом, при этом есть возможность сайт-специфического введения модификаций.

В настоящее время аптасенсоры – биосенсоры на основе аптамеров – активно разрабатываются с привлечением самых разных физических принципов

детекции: от спектроскопии до электрохимических устройств. Одно из перспективных сочетаний – аптамеры и спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР), где аптамеры определяют специфичность определения аналита, а ГКР позволяет достичь высокой чувствительности сенсора. Дополнение ГКР-сенсора мембранными технологиями позволяет решать задачи концентрирования и очистки образцов перед получением ГКР-спектра.

Последняя пандемия актуализировала разработку экспресс-тест-систем для специфического высокочувствительного определения патогенов. Ранее нами была предложена тест-система на основе мембраны с ГКР-активной поверхностью, функционализированная ДНК-аптамерами к вирусу гриппа А. Предел обнаружения достигал 10 вирусных частиц в пробе. Мембранная фильтрация также совместима с тест-системой на основе коллоидных наночастиц серебра, позволяя достигать предел обнаружения $2 \cdot 10^2$ вирусных частиц гриппа А в пробе. Достижимые пределы обнаружения перечисленных тест-систем сопоставимы с полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией, золотым стандартом диагностики респираторных вирусов.

Аналогично, аптамеры были успешно совмещены с органическим полевым транзистором с электролитическим затвором (EGOFET). Это портативное устройство перспективно для применения в биосенсорике. Были разработаны сенсоры для определения вирусов гриппа А в проточной ячейке, а также сенсоры на основе мембраны, функционализированной аптамерами, для задач с предварительным концентрированием образцов.

Полученные результаты позволяют расширить набор узнающих элементов биосенсоров для определения возбудителей вирусных заболеваний.

**ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ ВИРУСА МИКСОМЫ И
ДОКСОРУБИЦИНА НА МЫШИНОЙ BALB/C NUDE PDX МОДЕЛИ
САРКОМЫ МЯГКИХ ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА**

Исаева А.С.^{1,2}, Ветчинова А.С.¹, Ходакова Д.В.³, Аушева Т.В.³,

Гончарова А.С.³, Малоголовкин А.С.¹

¹*Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Лаборатория Молекулярной вирусологии, Москва*

²*Московский физико-технический институт, Физтех-школа биологической и медицинской физики, Москва*

³*Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Минздрава России, Испытательный лабораторный центр, Ростов-на-Дону*
e-mail: isaeva_a_s@staff.sechenov.ru

**THE ANTITUMOR EFFECT OF MYXOMA VIRUS AND DOXORUBICIN IN
A BALB/C NUDE PDX MOUSE MODEL OF HUMAN SOFT TISSUE
SARCOMA**

Isaeva A.S.^{1,2}, Vetchinova A.S.¹, Khodakova D.V.³, Ausheva T.V.³,

Goncharova A.S.³, Malogolovkin A.S.¹

¹*Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Laboratory of Molecular Virology, Moscow*

²*Moscow Institute of Physics and Technology, Phystech school of biological and medical physics, Moscow*

³*National Medical Research Centre for Oncology, Experimental laboratory Center, Rostov-on-Don*

Онколитические вирусы (ОВ) являются новым альтернативным методом лечения злокачественных новообразований в случае неэффективности или невозможности применения препаратов первой линии терапии. В настоящее время более 200 клинических испытаний на разных стадиях призваны

продемонстрировать терапевтический потенциал ОВ для лечения разных форм рака.

Целью нашего исследования является сравнение онколитического действия вируса миксомы на мышью BALB/c Nude PDX модели саркомы мягких тканей человека (CMT). Первичная конечная точка - сравнение динамики роста объема опухоли в группах терапии; вторичная конечная точка - сравнение уровня экспрессии в образцах опухоли генов, задействованных в онкологических и апоптотических каскадах: TNF, NF- κ B и Cas3.

PDX модель была создана путем подкожной имплантации в мышь фрагментов перевиваемого ксенотрансплантата CMT. В ходе эксперимента мыши были распределены на 4 группы по виду получаемой терапии (доксорубицин, вирус миксомы, физиологический раствор и группа совместного введения препаратов) по 6 особей в каждой. При достижении опухолевых узлов объема 50-100 мм³ производилось введение препаратов: доксорубицин - внутривенно в дозе 5 мг/кг, вирус миксомы - внутрь опухоли в количестве 10⁶ вч на животное по 2 раза в неделю в течение 30 дней. Перед введением препаратов проводилось измерение объема опухоли. По окончании эксперимента методом количественной ПЦР был проведен анализ уровня экспрессии в образцах опухоли TNF, NF- κ B и Cas3.

В результате работы мы показали увеличение объема опухоли во всех группах. Сравнение площади под кривыми роста опухоли (AUC) не показало статистически значимой разницы между группами терапии (F-тест Велша, $p=0.08$) (рис.1).

Сравнение уровня экспрессии TNF не показало статистически значимой разницы между группами терапии (F-тест Велша, $p=0.08$). Экспрессия NF- κ B в опухоли в группе совместного введения препаратов была ниже чем в группе доксорубицина (F-тест Велша, $p=0.004$; пост-хок анализ методом Хоторна-Бретца-Вествела, $p=0.03$). Уровень экспрессии Cas3 по сравнению с группой доксорубицина был ниже в группе вируса миксомы (F-тест Велша, $p=0.03$; пост-хок анализ методом Хоторна-Бретца-Вествела, $p=0.004$) и в группе совместного

применения препаратов (F-тест Велша, $p=0.03$; пост-хок анализ методом Хоторна-Бретца-Вествела, $p=0.007$) (рис.2).

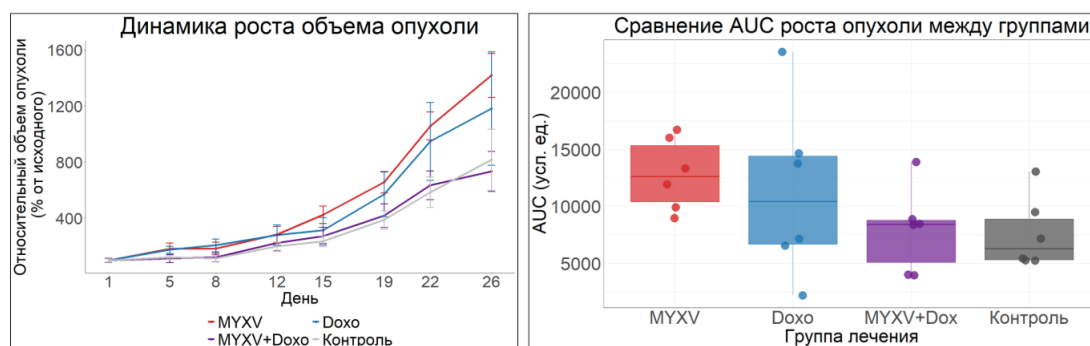


Рисунок 1 - Динамика роста объема опухоли и сравнение AUC роста опухоли

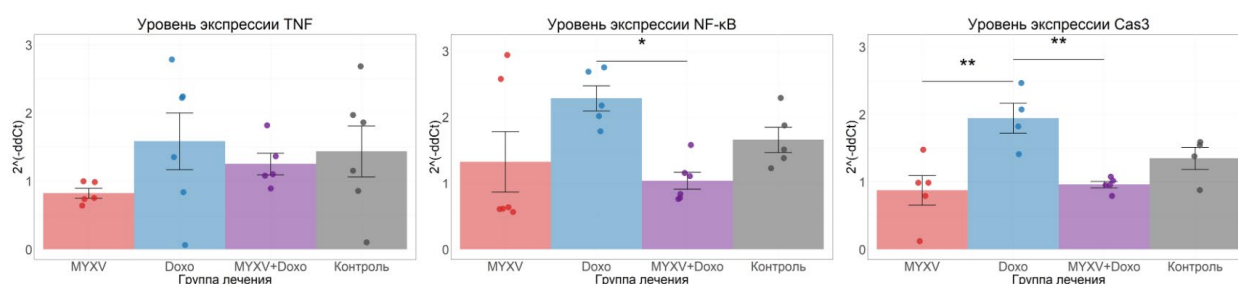


Рисунок 2 - Сравнение уровня экспрессии TNF, NF-kB и Cas3

Таким образом, доксорубицин и вирусы миксомы способны изменять экспрессию NF-kB и Cas3 в мышинной PDX модели СМТ, однако в поставленном эксперименте снижения объема опухоли и разницы в динамике роста опухоли не обнаружено. Причиной отсутствия эффективности препаратов в отношении замедления роста опухоли может быть дозировка и агрессивный характер новообразования. В перспективе можно рассмотреть изменение режима введения и повышения количества препаратов.

*Исследование выполнено при поддержке программы развития
Сеченовского Университета в рамках программы «Приоритет-2030».*

**РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ
АКТИВНОСТИ УНИВЕРСАЛЬНЫХ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ
IGA-ИЗОТИПА ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА**

Клотченко С.А.¹, Плотникова М.А.¹, Романовская-Романько Е.А.¹,

Алиев Т.К.²

¹ *ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, отдел
вакцинологии и иммунотерапии*

² *ИБХ РАН, Центр НТИ*

e-mail: fosfatik@mail.ru

**DEVELOPMENT AND STUDY OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF
UNIVERSAL NEUTRALIZING IGA ISOTYPE ANTIBODIES AGAINST
INFLUENZA VIRUS**

Klotchenko S.A.¹, Plotnikova M.A.¹, Romanovskaya-Romanko E.A.¹, Aliev T.K.²

¹ *Smorodintsev Research Institute of Influenza, Department of Vaccinology and
Immunotherapy*

² *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry*

Объектом разработки и исследования в настоящем проекте является интраназальный препарат для экстренной профилактики и лечения гриппа, представляющий собой человеческий рекомбинантный иммуноглобулин класса А.

Известно, что вакцины против гриппа стимулируют продукцию антител преимущественно к высоковариабельному головному отделу поверхностного белка гемагглютиниона (НА) вируса гриппа. Однако современные исследования показывают, что стеблевой домен НА подвержен значительно более низкой частоте мутаций, чем головка НА. Это приводит к тому, что моноклональные антитела или низкомолекулярные химические соединения, нацеленные на стебель НА, обычно обладают более широким спектром противовирусного действия.

Осуществлен поиск и отбор универсальных моноклональных антител

человека, обеспечивающих высокоэффективную перекрестную защиту в отношении вирусов гриппа А и В. Для этого проанализированы данные патентов и научных публикаций, находящихся в открытом доступе, на основании которых выбраны переменные последовательности кандидатных нейтрализующих антител, которые обладают широкой протективной активностью в отношении штаммов, циркулирующих в человеческой популяции на протяжении последних пятнадцати лет. Для дальнейших исследований выбраны нейтрализующие моноклональные антитела человека FI6, направленные против гемагглютинаина вируса гриппа А; антитела CR9114 и MEDI8852, направленные против гемагглютинаина вирусов гриппа А и В; а также антитело FNI9, направленное против нейраминидазы вирусов гриппа А и В.

Осуществлен химико-ферментативный синтез нуклеотидных последовательностей переменных доменов легких и тяжелых цепей выбранных антител на основании их первичных аминокислотных последовательностей, разработаны и накоплены плазмидные конструкции для получения этих антител.

Для наработки рекомбинантных антител использована двухплазмидная система pcDNA3.4/pOptiVEC, кодирующая тяжелую и легкую цепи иммуноглобулина. Данные высокоэкспрессионные плазмидные векторы, предназначенные для накопления белков в эукариотических клеточных линиях, были модифицированы и содержали константные участки цепей антител, а также универсальные последовательности сигнальных пептидов, за которыми методами генной инженерии вставляли соответствующие переменные области выбранных антител.

Биосинтез экспериментальных образцов рекомбинантных антител осуществляли в суспензионной культуре клеток *CHO* в режиме транзientной экспрессии в бессывороточной среде. Экспериментальные образцы рекомбинантных антител, содержащие тяжелую цепь IgG1-изотипа, очищали на колонке HiTrap MabSelect SuRe (США). Принцип метода очистки белка основан на факте прочного аффинного связывания белка А с Fc-фрагментом

иммуноглобулинов. Так как целевой рекомбинантный белок содержит Fc-фрагмент IgG1, то при прохождении через хроматографическую колонку супернатанта после центрифугирования клеточной культуры происходит сорбция рекомбинантного белка на колонке. Экспериментальные образцы рекомбинантных антител, содержащие тяжелую цепь IgA1- и IgA2m1-изотипов, очищали методом аффинной хроматографии на носителе KappaSelect (США).

Анализ чистоты и гомогенности полученных экспериментальных образцов рекомбинантных антител проводили электрофоретическим и хроматографическим методами. Профиль электрофореграмм в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях подтверждает подлинность молекулярной массы полученных образцов.

Исследована биологическая активность полученных экспериментальных образцов рекомбинантных антител в отношении вирусов гриппа А и В *in vitro*. Способность препаратов антител аффинно связываться с вирусными антигенами проанализирована методом ИФА. Для этого в качестве сорбирующих лигандов использована панель вирусов гриппа, содержащих различные подтипы поверхностных гликопротеинов — гемагглютенина и нейраминидазы. В экспериментах использовано два штамма вируса гриппа А (А/California/07/09 и А/Texas/50/12) подтипов H1N1pdm09 и H3N2, наиболее широко распространенных в человеческой популяции, а также два штамма вируса гриппа В Викторианской и Ямагатской линий (В/Brisbane/46/15 (Victoria) и В/Phuket/3073/13 (Yamagata)).

Методом ИФА показано, что полученные рекомбинантные антитела выявляют все использованные в работе референс-штаммы вируса гриппа. Не обнаружено достоверных различий в аффинности между IgA1-, IgA2m1- и IgG1-изотипами одного и того же клона антитела. По результатам оценки аффинности связывания в качестве наиболее перспективных кандидатов для дальнейшей работы выбраны антитела CR9114 и FNI9.

Проведена оценка вируснейтрализующей активности полученных рекомбинантных антител на клетках MDCK с использованием эталонных

штаммов вируса гриппа первой и второй филогенетической группы (H1N1, H1N1pdm09, H3N2, H5N1). В работе использованы штаммы вируса гриппа A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1pdm), A/California/07/09 (H1N1pdm), A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), A/Cambodia/E0826360/2020 (H3N2) и A/Vietnam/1194/04 (H5N1) (NIBRG-14). Детекцию степени ингибирования цитопатического действия вируса гриппа оценивали методом РГА. По результатам построения кривой «доза–эффект» на основании трех независимых повторов для каждого из препаратов антител определены значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}) в реакции микронеutralизации с использованием эталонных штаммов вируса гриппа.

Согласно полученным результатам, все исследованные препараты рекомбинантных антител проявляли нейтрализующую активность в отношении эталонных штаммов. Показатели IC_{50} в зависимости от клона антитела, его изотипа и эталонного штамма варьировали в диапазоне от 1 нг/мл до 70 нг/мл. Достоверных различий между полученными значениями IC_{50} для разных изотипов одного и того же клона антитела не выявлено. По результатам реакции микронеutralизации в качестве наиболее перспективных кандидатов для дальнейшей работы выбрано антитело CR9114, направленное против гемагглютиниона, и антитело FN19, направленное против нейраминидазы.

**ЛЕКАРСТВО БУДУЩЕГО ЗАЛОЖЕНО В ГЕНАХ: РЕЗУЛЬТАТЫ I
ФАЗЫ МНОГОЦЕНТРОВОГО КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ
ПРЕПАРАТА СТИМОТИМАГЕН КОПОЛИМЕРПЛАЗМИД**

Кондратьева С.А.^{1,2}, Жукова Л.Г.³, Самойленко И.В.⁴, Ашрафян Л.А.⁵,

Кокшаров М.О.², Алексеенко И.В.^{1,2}

*1 – ФГБУН ГНЦ Институт биоорганической химии им. академиков М.М.
Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Группа генной иммуноонкотерапии*

2 - ООО «Генная Хирургия»

3 - Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова

4 - Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н.

Блохина

*5 - Национальный медицинский исследовательский центр акушерства,
гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова*

e-mail: sofia.a.kondr@gmail.com

**THE MEDICINE OF THE FUTURE IS IN THE GENES: RESULTS OF
MULTICENTER PHASE I CLINICAL TRIAL OF THE DRUG
STIMOTIMAGENE COPOLYMERPLASMID**

Kondratieva S.A.^{1,2}, Zhukova L.G.³, Samoylenko I.V.⁴, Ashrafian L.A.⁵,

Koksharov M.O.¹, Alekseenko I.V.^{1,2}

1 – Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry

2 - «Gene Surgery» LLC

3 - GBUZ Moscow Clinical Scientific Research Center named after A. S. Loginov

DZM, Moscow, Russian Federation

4 - National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin,

Moscow, Russian Federation

5 - Federal State Budget Institution Research Center for Obstetrics, Gynecology and

Perinatology of the Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russian

Federation

Цель исследования. Изучение безопасности, переносимости и

фармакокинетики препарата АнтионкоРАН-М на фоне инфузий ганцикловира после его внутриопухолевого введения в возрастающих дозах в трех режимах дозирования пациентам с солидными опухолями поздних стадий.

Актуальность. Препарат «АнтионкоРАН-М» - это первый российский невирусный генотерапевтический препарат для лечения рака, который получил разрешение от Министерства здравоохранения Российской Федерации на проведение клинических исследований. Результаты I фазы по изучению безопасности препарата «АнтионкоРАНМ» позволяют переходить к последующим фазам клинических исследований и приблизить момент, когда его смогут получать онкологические пациенты.

Материал и методы. Препарат «АнтионкоРАН-М» (МНН «Стимотимаген кополимерплазмид») представляет собой комплекс невирусного носителя (блоксополимер полиэтиленгликоль: полиэтиленимин: ТАТ-пептид) и плазмидной ДНК, несущей два гена: ген тимидинкиназы вируса простого герпеса HSVtk и ген гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека hGM-CSF. Терапия с использованием препарата «АнтионкоРАН-М» двустадийна: на первом этапе непосредственно в опухоль вводят препарат «АнтионкоРАН-М», на втором этапе внутривенно вводят пролекарство ганцикловир.

В многоцентровое открытое исследование I фазы (дизайн «3+3») было последовательно рандомизировано 13 пациентов с меланомой, саркомой, карциномой молочной железы и плоскоклеточным раком перианальной области, распределенных в 4 когорты. Пациентам было выполнено внутриопухолевое введение препарата «АнтионкоРАН-М» в дозе 20-40 мкг плДНК/см³ однократно, двукратно или трехкратно с интервалом 5 дней в зависимости от запланированного режима дозирования на фоне внутривенного 15-дневного введения ганцикловира. Биораспределение препарата оценивалось с помощью метода ПЦР в реальном времени посредством количественной оценки содержания плазмидной ДНК в периферической крови, моче, а также биоптате опухолевой ткани пациентов. Результаты. «АнтионкоРАН-М» показал

благоприятный профиль безопасности, не было зафиксировано ни одного серьезного нежелательного явления (СНЯ), связанного с применением препарата, переносимость лечения оценивалась как удовлетворительная/хорошая, не была достигнута дозолимитирующая токсичность (СТСАЕ 5.0). Препарат характеризуется максимальным содержанием в опухолевой ткани, линейным нарастанием концентрации в сыворотке крови, достигающей своего максимума через 4-8 часов после введения, а затем элиминацией до недетектируемого уровня к точке наблюдения День 90 у большинства пациентов.

Выводы. Препарат «АнтионкоРАН-М» имеет благоприятный профиль безопасности. По результатам исследования оптимальной терапевтической дозой выбрана доза 40 мкг на см³ опухолевого очага в режиме трехкратного введения с интервалом 5 дней.

УНИВЕРСАЛЬНЫЕ ТЯЖЕЛОЦЕПОЧЕЧНЫЕ АНТИТЕЛА, НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ ШИРОКИЙ СПЕКТР ВАРИАНТОВ ВИРУСА SARS-COV-2

Коробкова А.И., Фаворская И.А., Должикова И.В., Щебляков Д.В.

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

e-mail: nastinium@gmail.com

HEAVY-CHAIN ANTIBODIES BROADLY NEUTRALIZE A WIDE RANGE OF SARS-COV-2 VARIANTS

Korobkova A.I., Favorskaya I.A., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V.

Federal State Budget Institution "National Research Center for Epidemiology and Microbiology Named after Honorary Academician N.F. Gamaleya" of the Ministry of Health of the Russian Federation

Цель. На основе однодоменного антитела 1p1.B10, нейтрализующего широкий спектр вариантов вируса SARS-CoV-2, получить тяжелоцепочечное антитело 1p1.B10-Fc с улучшенными нейтрализующими свойствами и терапевтической активностью.

Актуальность. Необходимость разработки универсального средства этиотропной терапии COVID-19 для лечения пациентов из группы риска тяжелого течения заболевания, а также для профилактики COVID-19 у иммунокомпрометированных лиц.

Методы. Последовательность тяжелоцепочечного антитела 1p1.B10-Fc получали путем слияния однодоменного антитела 1p1.B10 с Fc-фрагментом IgG1 человека с помощью ПЦР и клонировали в вектор pcDNA3.4. Продукцию антитела осуществляли методом транзientной трансфекции клеток линии CHO-S. Очистку проводили с помощью аффинной хроматографии. Специфическое связывание антитела с S-белком оценивали методом ИФА. Способность антитела подавлять цитопатическое действие вируса исследовали на культуре клеток Vero E6 в реакции нейтрализации различных вариантов вируса SARS-CoV-2. Протективную активность 1p1.B10-Fc изучали *in vivo* на модели инфекции сирийских хомячков, вызванной вариантами вируса B.1.1.1 (Ухань D614G), XBB.1.16, EG.5.1, XBB.1.9.1 и JN.1.

Результаты. Тяжелоцепочечное антитело 1p1.B10-Fc было продуцировано в эукариотической системе экспрессии и очищено с помощью аффинной хроматографии. Оценка нейтрализующей активности с использованием широкой панели вариантов вируса SARS-CoV-2 показала, что полученное тяжелоцепочечное антитело в низкой концентрации способно нейтрализовать цитопатическое действие всех проанализированных вариантов, включая ранние варианты B.1.1.1, B.1.1.7, B.1.351, B.1.1.28 и B.1.617.2, более поздние варианты BA.1, BA.2, BA.3, XBB.1, XBB.1.5, XBB.1.9.1, EG.5.1, XBB.1.16, а также недавно возникшие варианты JN.1 и KS.1. При этом нейтрализующая активность тяжелоцепочечного антитела существенно превышает активность 1p1.B10 в однодоменном формате (Рисунок 1). На модели сирийских хомячков было

показано, что однократное терапевтическое введение антитела 1p1.B10-Fc в дозе 1 мг/кг после заражения различными вариантами вируса SARS-CoV-2 (B.1.1.1, XBB.1.16, EG.5.1, XBB.1.9.1 и JN.1) приводит к значительному снижению вирусной нагрузки в легких вплоть до недетектируемого уровня (Рисунок 2).

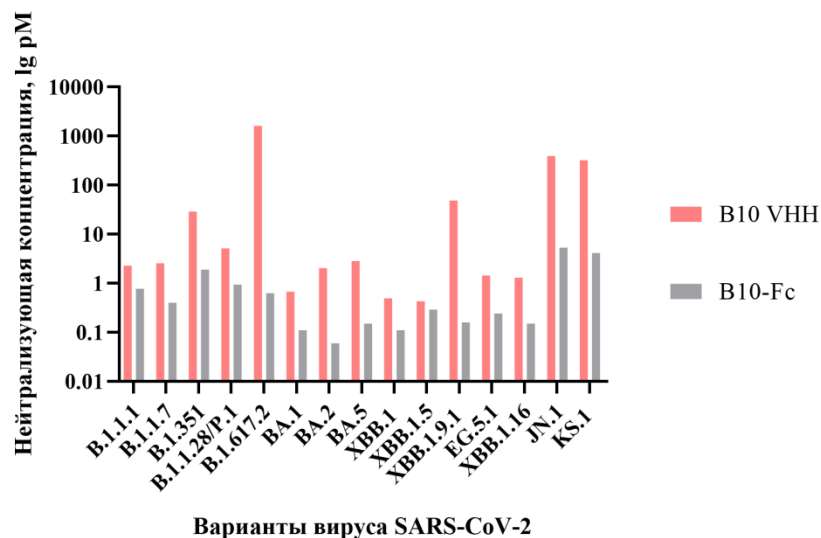


Рисунок 1 - Оценка нейтрализующей активности тяжелоцепочечного антитела 1p1.B10-Fc и однодоменного антитела 1p1.B10

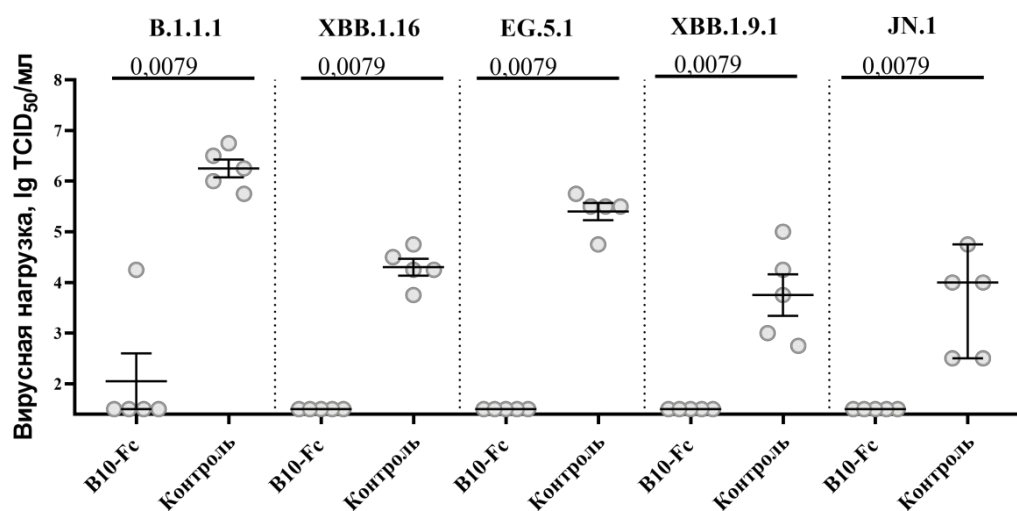


Рисунок 2 - Оценка терапевтической активности антитела 1p1.B10-Fc на модели сирийских хомячков

Выводы. В результате работы было получено тяжелоцепочечное антитело 1p1.B10-Fc, характеризующееся улучшенными показателями нейтрализующей

активности. Антитело в пикомолярной концентрации подавляло цитопатическое действие всех проанализированных вариантов вируса SARS-CoV-2. 1p1.B10-Fc в низкой дозе 1 мг/кг успешно защищало сирийских хомячков от инфекции, вызванной различными вариантами вируса, включая эволюционно далекие варианты B.1.1.1 (Ухань D614G) и JN.1, что делает его перспективным кандидатом при разработке универсального средства профилактики и терапии COVID-19.

*Работа выполнена при поддержке Департамента здравоохранения
города Москвы.*

**ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА SCFV-ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ,
ОБЛАДАЮЩИХ НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ В
ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ ГРИППА ТИПА А**

Плотникова М.А., Клотченко С.А.

*ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, отдел
вакцинологии и иммунотерапии*

e-mail: biomalinka@mail.ru

**ANTIVIRAL PROPERTIES OF SCFV-FRAGMENTS OF ANTIBODIES
WITH NEUTRALIZING ACTIVITY AGAINST INFLUENZA A VIRUS**

Plotnikova M.A., Klotchenko S.A.

*Smorodintsev Research Institute of Influenza, Department of Vaccinology and
Immunotherapy*

Иммунотерапия с использованием моноклональных антител является этиотропным подходом к лечению, в основе которого лежит специфическое воздействие на факторы, провоцирующие заболевание. Целью представленной работы являлась разработка и оценка противовирусного потенциала scFv-фрагментов (одноцепочечных вариабельных фрагментов, *single chain variable*

fragments), полученных на основе антитела FI6, специфичного к поверхностному белку — гемагглюнину вируса гриппа.

На основе антитела FI6 [1], обладающего широким протективным действием в отношении различных штаммов вируса гриппа А, нами был разработан дизайн его scFv-фрагмента с использованием программного обеспечения UGENE (рисунок 1). Химерная конструкция содержала сигнальный пептид, переменные домены антитела в ориентации VL-VH, соединённые гибким (G₄S)₄-линкером, а также гистидиновый таг на С-конце [2, 3]. Для эукариотической экспрессии scFv были созданы плазмидные конструкции на основе вектора pIRESneo3, имеющего hCMV промотор. Накапливание scFv проводили в эукариотической клеточной линии HEK293 в присутствии антибиотика G418 в конечной концентрации. 10 мкг/мл. Очистку scFv из культуральной жидкости проводили методом металл-аффинной хроматографии на системе AKTA pure с использованием колонки Polac MC60-Ni Excel объёмом 1 мл (Seraph, Китай).

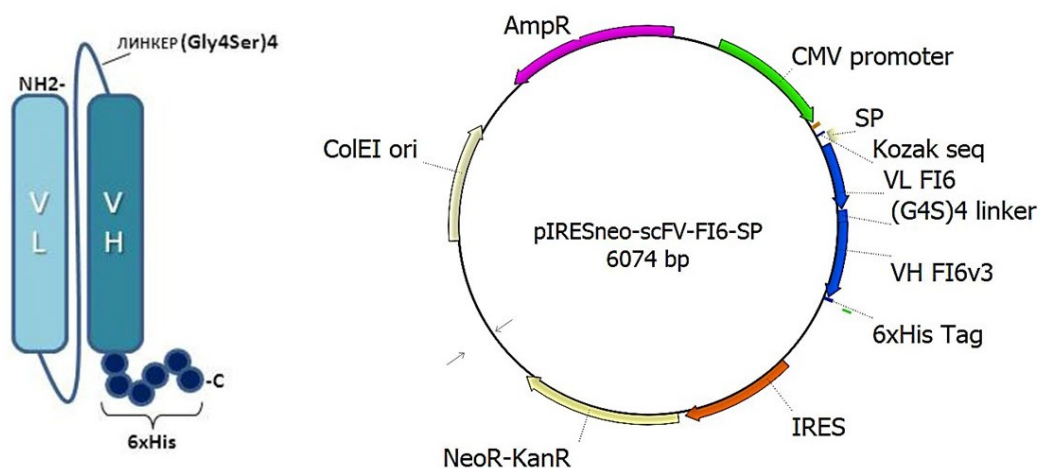


Рисунок 1 - Принципиальное строение scFv-фрагмента (слева) и кодирующая его плазмидная конструкция (справа)

Полученный белок был охарактеризован методом электрофореза в ПААГ, его длина в восстанавливающих условиях соответствовала ожидаемой — 28,9 кДа. Нами были получены эукариотические пулы конститутивных продуцентов, обеспечивающие выход scFv-продукта в количестве не менее 15 мкг/мл. Была

показана специфическая активность полученных scFv в отношении различных подтипов вируса гриппа А: H1N1pdm, H2N2, H3N2, H5N1, относящихся к первой и второй антигенным подгруппам гемагглютиниона; а также в отношении вирусов гриппа В. Исследование выполняли методом ИФА, используя для сорбции эталонные вирусы разных подтипов; а для детекции — anti-His антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (HyTest, Россия).

Фрагмент scFv ожидаемо [4] показал высокую связывающую активность с современными циркулирующими в человеческой популяции штаммами H1N1pdm и H3N2, а также с другими штаммами гриппа А, но не гриппа В. Наконец, было изучено вируснейтрализующее действие scFv-фрагмента в отношении вирусов гриппа A/California/7/09 (H1N1pdm) и A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2).

Препарат scFv-FI6 демонстрировал способность к нейтрализации стандартных штаммов. Значение IC_{50} для scFv-FI6 было равно 170 нг/мл, в то время как для референсного антитела IgG-FI6 доза IC_{50} составила 179 нг/мл для вируса H1N1pdm. Аналогично, значения IC_{50} для H3N2 — 246 нг/мл и 258 нг/мл, для scFv и IgG, соответственно, были сопоставимы. Статистически значимые различия между значениями IC_{50} для родительского антитела IgG-FI6 и его scFv-фрагмента установлены не были.

Таким образом, высокая вируснейтрализующая протективная активность и производственный потенциал разработанных scFv на основе нейтрализующего антитела FI6 определяют фармакологическую целесообразность применения такого класса препаратов для терапии гриппа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, Соглашение № 24-25-00488, название проекта: «Изучение противовирусного потенциала внутриклеточных scFv антител к гриппу» (руководитель — С.А. Клотченко), <https://rscf.ru/project/24-25-00488/>.

Литература:

1. Corti, D., Agatic, G., Bianchi, S., Giacchetto-sasselli, I., Calder, L.,

Langedijk, J. P. M., Skehel, J. J., & Lanzavecchia, A. (2011). A Neutralizing Antibody Selected from. *Science (New York, N.Y.)*, 333(August), 850–856.

2. Schaefer, J. V., Honegger, A., & Plückthun, A. (2010). Construction of scFv Fragments from Hybridoma or Spleen Cells by PCR Assembly. In R. Kontermann & S. Dubel (Eds.), *Antibody Engineering* (Issue 1, pp. 21–44). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04605-0_2.

3. Helfrich, W., Haisma, H. J., Magdolen, V., Luther, T., Bom, V. J. J., Westra, J., Van Der Hoeven, R., Kroesen, B. J., Molema, G., & De Leij, L. (2000). A rapid and versatile method for harnessing scFv antibody fragments with various biological effector functions. *Journal of Immunological Methods*, 237(1–2), 131–145. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00220-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00220-3).

4. Kallewaard, N. L., Corti, D., Collins, P. J., Neu, U., McAuliffe, J. M., Benjamin, E., Wachter-Rosati, L., Palmer-Hill, F. J., Yuan, A. Q., Walker, P. A., Vorlaender, M. K., Bianchi, S., Guarino, B., De Marco, A., Vanzetta, F., Agatic, G., Foglierini, M., Pinna, D., Fernandez-Rodriguez, B., ... Skehel, J. J. (2016). Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes. *Cell*, 166(3), 596–608. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.073>.

**РЕГУЛЯЦИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ФЕНОТИПА
ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ СИНОВИОЦИТОВ ПРИ
РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
НАПРАВЛЕННОГО БЛОКИРОВАНИЯ ФНОА ДНК-АПТАМЕРАМИ**

Соловьева А.О¹, Риппинен Д.В¹, Воробьева М.А², Королев М.А¹

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной
лимфологии – филиал ИЦиГ СО РАН, лаборатория фармакологических
активных соединений

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
лаборатория химии РНК
e-mail: solovevaao@yandex.ru

**REGULATION OF THE INFLAMMATORY PHENOTYPE OF
FIBROBLAST-LIKE SYNOVIOCYTES IN RHEUMATOID ARTHRITIS
USING TARGETED BLOCKING OF TNF α WITH DNA APTAMERS**

Solovyeva A.O.¹, Rippinen D.V.¹, Vorobyeva M.A.², Korolev M.A.¹

*1 Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the
Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Laboratory of Pharmacologically Active
Compounds*

*2 Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Laboratory of
RNA Chemistry*

Ревматоидный артрит (РА) — хроническое иммуновоспалительное заболевание, приводящее к ранней инвалидизации пациентов. Цель работы — исследование возможности направленного ингибирования высокоспецифичными ДНК-аптамерами фактора некроза опухоли альфа (ФНО α) — ключевого провоспалительного цитокина в фибробластоподобных синовиоцитах (ФПС) пациентов с РА. Подавление активности ФПС позволит уменьшить воспаление, предотвратить деструкцию суставов и замедлить прогрессирование заболевания. Использование для воздействия на ФПС аптамеров в качестве альтернативы таргетным антителам направлено на разработку более безопасной, эффективной и доступной терапии РА.

Исследование выполнено на первичных культурах ФПС пациентов с РА. Было оценено таргетное влияние аптамеров на ФНО α -индуцированную секрецию ИЛ-6 и ММП13. В качестве ингибиторов ФНО α использовали описанные в литературе ДНК-аптамеры: aptTNF α [Lai, W.Y. 2019], T1, T4 [Mashayekhi, K. 2020], VR11 [Orava, E.W. 2013]. Все аптамеры были синтезированы в ИХБФМ СО РАН с модификацией 3'-конца (дополнительный тимидин, присоединенный 3'-3'-фосфодиэфирной связью) для повышения устойчивости к нуклеазам.

Наибольшую активность продемонстрировали аптамеры T4 и aptTNF α , сравнимую с моноклональным антителом цертолизумаб (таргетный

терапевтический препарат Симзия ®, ингибитор ФНО α): Базовая секреция ИЛ-6/ММП13 ФПС: $3,0 \pm 1,6$ пг/мл/2292 $\pm$ 44,5у.е. Стимулированная ФНО α : $12,5 \pm 1,5$ пг/мл/5185 $\pm$ 206у.е.; Симзия: $3,1 \pm 1,2$ пг/мл/2306 $\pm$ 226у.е.; aptTNF α : $4,9 \pm 0,3$ пг/мл/1729 $\pm$ 610у.е.; T4: $3,6 \pm 0,1$ пг/мл/2463 $\pm$ 721у.е.; VR11: $7,5 \pm 0,8$ пг/мл/2463 $\pm$ 752; T1: $9,4 \pm 2,0$ пг/мл/4404 $\pm$ 721у.е.; контрольный неаптамерный олигонуклеотид: $9,2 \pm 0,8$ пг/мл/3229 $\pm$ 610у.е (рис.1).

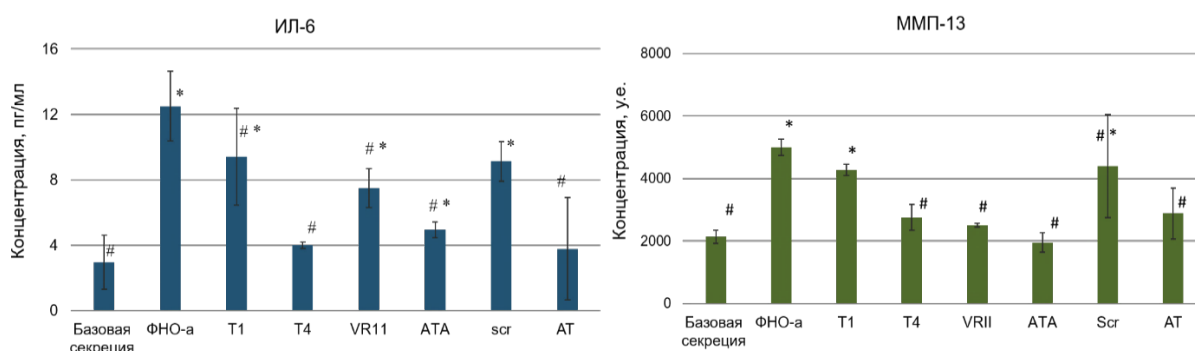


Рисунок 1 - Таргетное влияние аптамеров на ФНО α -индуцированную секрецию ИЛ-6 и ММП13 фибробластоподобными синовиоцитами от больных ревматоидным артритом, * - $p > 0,05$ действие ФНО- α совместно с Scr * - $p \leq 0,01$ при сравнении с уровнем базовой секреции, # - $p \leq 0,01$ при сравнении с индуцируемой ФНО- α секрецией

Показана высокая эффективность аптамеров T4 и aptTNF α в подавлении провоспалительной активности ФНО α в ФПС пациентов с РА, что делает их перспективными кандидатами для разработки таргетной терапии. Использование первичных культур ФПС повышает клиническую значимость работы, соответствуя трендам персонализированной медицины. Полученные данные открывают путь к созданию новых терапевтических стратегий, способных преодолеть ограничения существующих биопрепаратов и улучшить качество жизни пациентов с РА.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ № 25-25-00363.

АПТАМЕРЫ БЛОКИРУЮТ ОБРАЗОВАНИЕ ХОЛЕСТЕРИНСОДЕРЖАЩИХ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ

Суркова Р.С.^{1,2}, Собенин И.А.^{1,3}, Орехов А.Н.^{2,4}

¹*Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии,
лаборатория молекулярно-генетического моделирования инфламейджинга*

²*Научно-исследовательский институт атеросклероза*

³*Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии им.
академика В.Н., Смирнова, ФГБУ Национальный медицинский
исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова МЗ РФ,
лаборатория медицинской генетики*

⁴*Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии,
лаборатория ангиопатологии
e-mail: raisasurkova850@gmail.com*

APTAMERS BLOCK THE FORMATION OF CHOLESTEROL- CONTAINING CIRCULATING IMMUNE COMPLEXES

Surkova R.S.^{1,2}, Sobenin I.A.^{1,3}, Orekhov A.N.^{1,2}

¹*Research Institute of General Pathology and Pathophysiology*

²*Institute for Atherosclerosis Research*

³*V.N. Smirnov Institute of Experimental Cardiology, E.I. Chazov National Medical
Research Center of Cardiology*

Актуальность. Развитие атеросклероза начинается с накопления модифицированных липопротеинов низкой плотности (ЛНП) в субэндотелиальном пространстве артериальной стенки. Одной из наиболее известных атерогенных модификаций ЛНП является десиалирование, то есть потеря терминальной сиаловой кислоты гликоконъюгатами, входящими в состав ЛНП [1]. Десиалированные ЛНП обладают высокой иммуногенностью и вызывают выработку аутоантител IgG, которые связываются с ЛНП, образуя циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) [2].

Целью работы было разработать методы для оценки прямого влияния аптамеров на образование ЦИК и провести скрининг аптамеров, блокирующих образование ЦИК, с помощью данных методов.

Материалы и методы. Аптамеры отбирали с помощью метода SELEX. В качестве биологического материала использовали сыворотку от больных ишемической болезнью сердца (Рис. 1). В исследование были включены 50 пациентов в возрасте старше 55 лет, мужчины. Из сыворотки крови выделяли ЛНП с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности KBr.

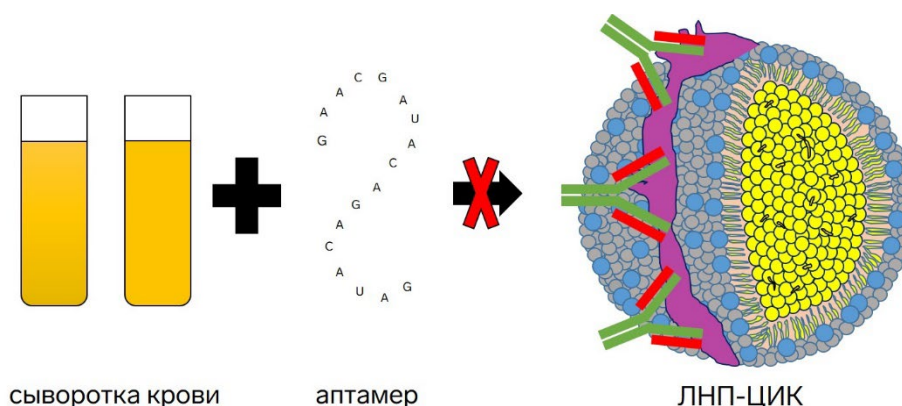


Рисунок 1 - Схема метода оценки влияния аптамеров на образование ЦИК в сыворотке крови

Проводили инкубацию аптамеров (10 нмоль/л) с сывороткой при 37°C в течении 1 часа, выделяли ЦИК с помощью раствора ПЭГ-6000 и измеряли содержание холестерина ЛНП-ЦИК. При проведении второй методики к ЛНП кроме аптамеров добавляли антитела к аполипопротеину В100 (АроВ) для усиления блокирующего действия аптамеров.

Дополнительно разрабатывалась методика, которая является вариантом иммуноферментного анализа (ИФА). Коммерческие поликлональные антитела (2 мкг/мл) против АроВ предварительно наносили на 96-луночный планшет. Далее в лунки добавляли ЛНП (2 мкг/мл) и аптамеры с разными концентрациями (от 80 нмоль/л до 2,5 нмоль/л), инкубировали в течение 90 минут при 37°C. Дальнейшие этапы проведения анализа аналогичны классической ИФА.

Результаты. Были разработаны методики для оценки влияния аптамеров на образование ЛНП-ЦИК и проведен скрининг 16 аптамеров с помощью данных методов.

Таким образом, наиболее эффективными блокирующими агентами в отношении образования холестерин-содержащих ЦИК как в сыворотке крови так и в выделенных из сыворотки крови ЛНП являются аптамеры 1Yn и 3N3.

Заключение. Аптамеры можно рассматривать в качестве перспективных агентов для блокирования образования ЛНП-ЦИК.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского
научного фонда, грант 23-65-10014.*

Литература:

1. Glanz V., Bezsonov E.E., Soldatov V., Orekhov A.N. Thirty-five-year history of desialylated lipoproteins discovered by Vladimir Tertov. Biomedicines, 2022, Vol. 10, no. 5, 1174. doi: 10.3390/biomedicines10051174.
2. Mezentsev A., Bezsonov E., Kashirskikh D., Baig M.S., Eid A.H., Orekhov A. Proatherogenic sialidases and desialylated lipoproteins: 35 years of research and current state from bench to bedside. Biomedicines, 2021, Vol. 9, no. 6, 600. doi: 10.3390/biomedicines9060600.

СОЗДАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ МИНИГЕНОВ АВСА4 ДЛЯ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ ШТАРГАРДТА Шимченко Д. М.¹, Кузьмин Е. А.², Покидова К.С.², Безсонов Е.Е.¹, Бондарь Н.И.¹, Коровина К. А.¹, Пьявченко Г.А.², Малоголовкин А.С.¹

¹ *Первый Московский государственный медицинский университет им.*

И.М.Сеченова, ИМПТuТБ им. Е.И. Марциновского

² *Первый Московский государственный медицинский университет им.*

И.М.Сеченова, кафедра анатомии и гистологии человека

e-mail: shimchenko_d_m@staff.sechenov.ru

CREATION OF FUNCTIONAL ABCA4 MINIGENES FOR GENE REPLACEMENT THERAPY FOR STARGARDT DISEASE

Shimchenko D. M.¹, Kuzmin E. A.², Pokidova K. S.², Bezsonov E. E.¹, Bondar N.

I.¹, Korovina K. A.¹, Pyavchenko G. A.², Malogolovkin A. S.¹

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, E.I. Martynovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Department of Human Anatomy and Histology

Наследственные патологии сетчатки человека являются объектом пристального внимания разработчиков геннотерапевтических продуктов особенно после одобрения первой генной терапии на основе аденоассоциированного вируса (ААВ) - Luxturna (voretigene neparvovec-rzyl) - для лечения Амавроза Лебера. Среди более 150 наследственных заболеваний сетчатки Болезнь Штаргардта (БШ), ассоциированная с мутациями в гене ABCA4, занимает доминирующую позицию по частоте встречаемости (1:10 000) [1].

ААВ остается одним из самых популярных векторов для доставки трансгенов в клетки человека. К сожалению, ААВ не универсальны и имеют ограниченную емкость капсида ~ 4,7 кБ, что ограничивает возможность упаковки больших трансгенов [2].

Целью нашей работы являлось создание минимальных функционирующих копий генов ABCA4. Для выполнения этой цели была проведена аннотация доменной организации белка abca4, с учетом его 3D структуры были выбраны области доступные для миниатюризации и при помощи сравнительного моделирования (I-TASSER, Robetta и AlphaFold 2.0) выбраны варианты минигена формирующие структуру аналогичную полноразмерному белку abca4. Перспективные варианты последовательностей минигена ABCA4 были оптимизированы для экспрессии в клетках человека ARPE-19 и клонированы в экспрессионный вектор pAAB-miniABCA4. Упаковку минигенов ABCA4

проводили с использованием трехплазмидной системы (pAAB-miniABCA4, pHelper, pAAV2.7m8) и трансфекции клеток HEK293T. После трансдукции клеток ARPE-19 вирусом AAB-miniABCA4 при множественности заражения (MOI) 100,000 в.ч./ кл. с помощью ПЦР в реальном времени была показана экспрессия гена *ABCA4*.

Для подтверждения доставки трансгена в выбранном векторе pAAV2.7m8 проведен закол мышам препарата AAV-EGFP и иммуногистохимическое окрашивание сетчатки.

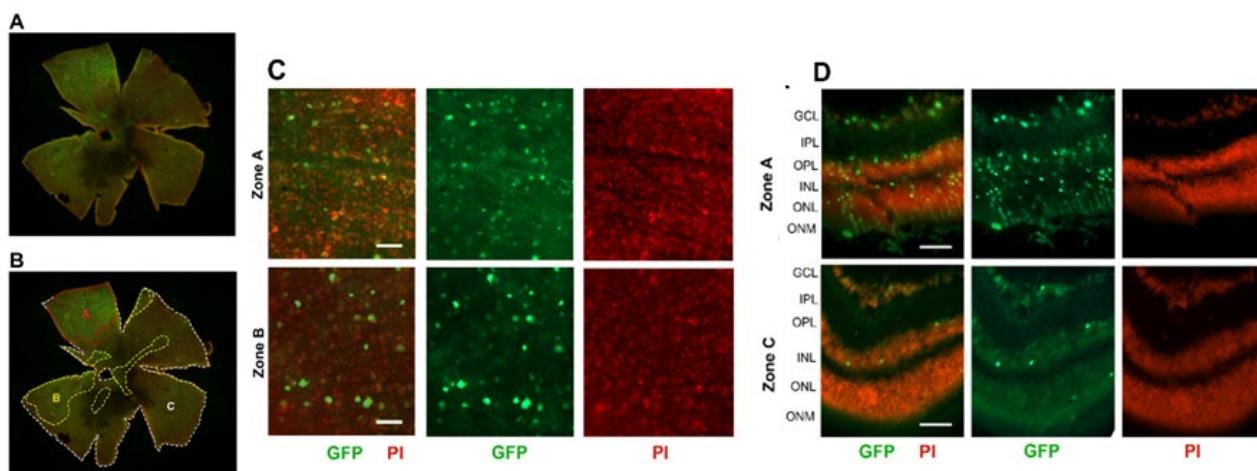


Рисунок 1 - Иммуногистохимическое окрашивание GFP сетчатки глаза мышей для детекции уровня GFP после субретинального введения препарата AAV-EGFP, где А, В – микрофотография окрашенной сетчатки; обозначение зон для анализа; С, D – иммунофлуоресцентные фото зон А, В, С в каналах GFP и PI

Продукция минибелка miniABCA4 подтверждена в клетках HEK293T.

Удалось сократить кодирующую последовательность ABCA4 на 30% (с 6,8 кб до 4,3 кб), что нивелировало проблему ограниченной емкости капсида AAV. Полученные в результате работы генетические конструкции верифицированы нуклеотидным секвенированием. Трансфекция клеточной линии HEK293 экспрессионным вектором pAAB-miniABCA4 показала экспрессию белка miniABCA4 в лизатах. Были подобраны условия для трансдукции клеток ARPE19 вирусом AAB-miniABCA4. При множественности заражения (MOI)

100,000 в.ч./ кл. и инкубации в течение 5 суток экспрессия miniABCA4 была показана с помощью ПЦР в реальном времени.

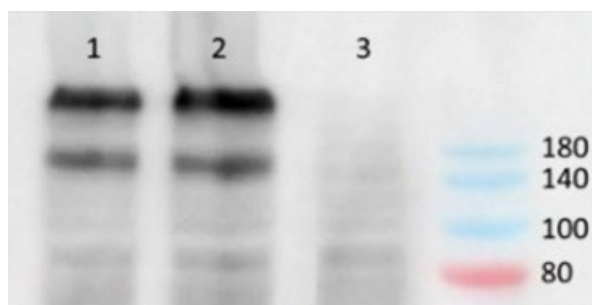


Рисунок 2 - Вестерн-блот анализ лизатов клеток HEK293, где 1,2 - лизаты клеток, трансфицированных pAAV-miniABCA4; 3 - лизат нетрансфицированных клеток HEK293

Работа выполнена при поддержке программы развития Сеченовского Университете в рамках программы “Приоритет-2030”.

Литература:

1. Tanna, P., Strauss, R. W., Fujinami, K., & Michaelides, M. (2017). Stargardt disease: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. *The British journal of ophthalmology*, 101(1), 25–30.
2. Li C, Samulski RJ. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*. 2020 Apr;21(4):255-272. doi: 10.1038/s41576-019-0205-4. Epub 2020 Feb 10. PMID: 32042148.

**ДВОЙНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ КЛЕТКИ И
СОСУДИСТОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ ОПУХОЛИ С ПОМОЩЬЮ
МУЛЬТИТАРГЕТНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГИБРИДНЫХ БЕЛКОВ**

Яголович А.В.^{1,2,3}, Исакова А.А.^{1,2}, Долгих Д.А.^{1,2}, Гаспарян М.Э.^{1,3}

¹*Государственный научный центр Российской Федерации Институт
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, лаборатория инженерии белка*

²*Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова,
Биологический факультет, кафедра биоинженерии*

³*Общество с ограниченной ответственностью «Манебио»
yagolovichav@my.msu.ru*

**DUAL EFFECT ON MALIGNANT CELLS AND THE VASCULAR TUMOR
MICROENVIRONMENT WITH MULTITARGET RECOMBINANT FUSION
PROTEINS**

Yagolovich A.V.^{1,2,3}, Isakova A.A.^{1,2}, Dolgikh D.A.^{1,2}, Gasparyan M.E.^{1,3}

*1 Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy
of Sciences*

2 Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology

3 Limited Liability Company "Manebio"

Активация сигнальных путей цитокина TRAIL, в первую очередь рецептора DR5, приводит к селективной элиминации опухолевых клеток путем апоптоза [1]. В то же время активация тирозинкиназных рецепторов VEGFR и FGFR играет важную роль как в пролиферации трансформированных клеток, так и в формировании опухолевого микроокружения [2]. Цель работы заключалась в разработке мультитаргетных гибридных белков, одновременно активирующих DR5-опосредованный путь клеточной гибели и блокирующих сигнальные пути VEGF/VEGFR и FGF/FGFR.

Был получен набор рекомбинантных гибридных белков на основе DR5-специфичного цитокина TRAIL с эффекторными антагонистическими

пептидами, блокирующими взаимодействия VEGF/VEGFR и FGF/FGFR. Экспрессия проводилась в *E.coli* с последующей хроматографической очисткой. Исследование связывания с рецепторами-мишенями с помощью иммуноферментного анализа показало аффинность к DR5, VEGFR2 и FGFR1 в наномолярном диапазоне. Противоопухолевое действие *in vitro* изучали на опухолевых клеточных линиях человека различного происхождения: показана повышенная цитотоксичность гибридных белков на большинстве линий по сравнению с немодифицированным лигандом. Действие *in vivo* исследовали на ксенотрансплантатных моделях солидных опухолей человека в иммунодефицитных мышах. Торможение роста опухолей под действием гибридных белков достигало 50-70%. Исследование антиангиогенных эффектов методами оптоакустической томографии и иммуногистохимического окрашивания на маркер сосудов CD31 показало снижение васкуляризации опухолевой паренхимы до 50%. В результате был показан вклад пептидов-антагонистов рецепторов VEGFR2 и FGFR1 в противоопухолевое и антиангиогенное действие гибридных белков *in vivo*.

Таким образом, мультитаргетные белки, нацеленные на рецепторы DR5, VEGFR2 и FGFR1, обеспечивают комплексное ингибирование опухолевого роста путем двойного воздействия на злокачественные клетки и сосудистое микроокружение опухоли. Технологическая доступность получения рекомбинантных гибридных белков и высокая биологическая активность позволяют рассчитывать на трансляцию в клиническую практику для лечения солидных васкуляризованных опухолей.

Исследование поддержано грантом РНФ № 24-14-00250.

Литература:

1. Gasparian M.E. et al. Apoptosis. 2009. Jun;14(6):778-87.
2. Liu G., et al. Cell Prolif. 2021. Apr;54(4):e13009.
2. Вакцины

**ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ВАКЦИННОГО
ШТАММА 17D ВИРУСА ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКИ В ОТНОШЕНИИ
РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ДОКЛИНИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЯХ**

***Бирюкова Ю.К., Трачук К.Н., Назаренко А.С., Орлова Е.А., Ворович М.Ф.,
Пестов Н.Б., Ишмухаметов А.А., Колясникова Н.М.***

*ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки
иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт
полиомиелита)*

e-mail: biryukova_jk@chumakovs.ru

**IMMUNOTHERAPEUTIC POTENTIAL OF YELLOW FEVER VIRUS
VACCINE STRAIN 17D IN PRECLINICAL STUDIES OF PANCREATIC
CANCER**

***Biryukova Yu.K., Trachuk K.N., Nazarenko A.S., Orlova E.A., Vorovitch M.F.,
Pestov N.B.,
Ishmukhametov A.A., Kolyasnikova N.M.***

*Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-
Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis)*

Цель: изучение иммунотерапевтического потенциала вакцинного штамма 17D вируса желтой лихорадки (17D ВЖЛ) в отношении рака поджелудочной железы на сингенной модели в иммунокомпетентных мышах и на ксенотрансплантатах опухоли человека в иммунодефицитных мышах линии Nude.

Актуальность: онколитические вирусы представляют собой перспективный класс иммунотерапевтических агентов для борьбы со злокачественными новообразованиями. Они способны не только селективно инфицировать и лизировать опухолевые клетки, а также модифицировать микроокружение опухоли, активируя противоопухолевый иммунитет [1]. Вакцинный штамм 17D ВЖЛ является перспективным кандидатом, так как его

иммуногенность и безопасность доказана многолетним (70 лет) использованием в вакцинопрофилактике желтой лихорадки. Эффективность 17D уже продемонстрирована *in vitro* в отношении различных опухолевых клеточных линий. На базе ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) налажено производство вакцины в соответствии со стандартами GMP.

Материалы: мыши линейные C57BL/6 (SPF, Новосибирск), мыши Nu/J (SPF, Новосибирск); штамм 17D ВЖЛ, клеточные линии – аденокарцинома протоков поджелудочной железы мыши Pan02, карцинома протоков поджелудочной железы человека PANC-1.

Результаты: продемонстрирован иммуноопосредованный потенциал 17D ВЖЛ в лечении подкожных опухолей на сингенной модели Pan02 [2], особенно с улучшенными эффектами у предварительно иммунизированных животных. Однократное введение ВЖЛ 17D не иммунизированным мышам увеличивало время дожития до гуманной точки в среднем на 30%, в то же время предварительная иммунизация увеличивала среднее время дожития мышей на 60% (**Рис. 1**), а тот факт, что иммунизация не снижает эффективность, а наоборот заметно увеличивает ее, обеспечивая дополнительную безопасность, потенциально позволяет использовать более высокие дозы 17D для виротерапии.

На модели ксенотрансплантатов опухоли человека PANC-1 в иммунодефицитных мышях задержка роста опухолей в группе 17D терапии была еще более выраженной в сравнении с контрольной группой, так через 20 сут от первой инъекции 17D средний размер опухолей в группе терапии составлял 100 мм³, против 300 мм³ в группе, получавшей плацебо. Также наблюдалась выраженная инфильтрация опухоли иммунными клетками и снижение процессов ангиогенеза.

Вывод: Вакцинный штамм 17D ВЖЛ является перспективным кандидатом для иммунотерапии рака поджелудочной железы и требует дальнейших исследований, направленных на усиление его иммуногенных свойств и онкотропизма.

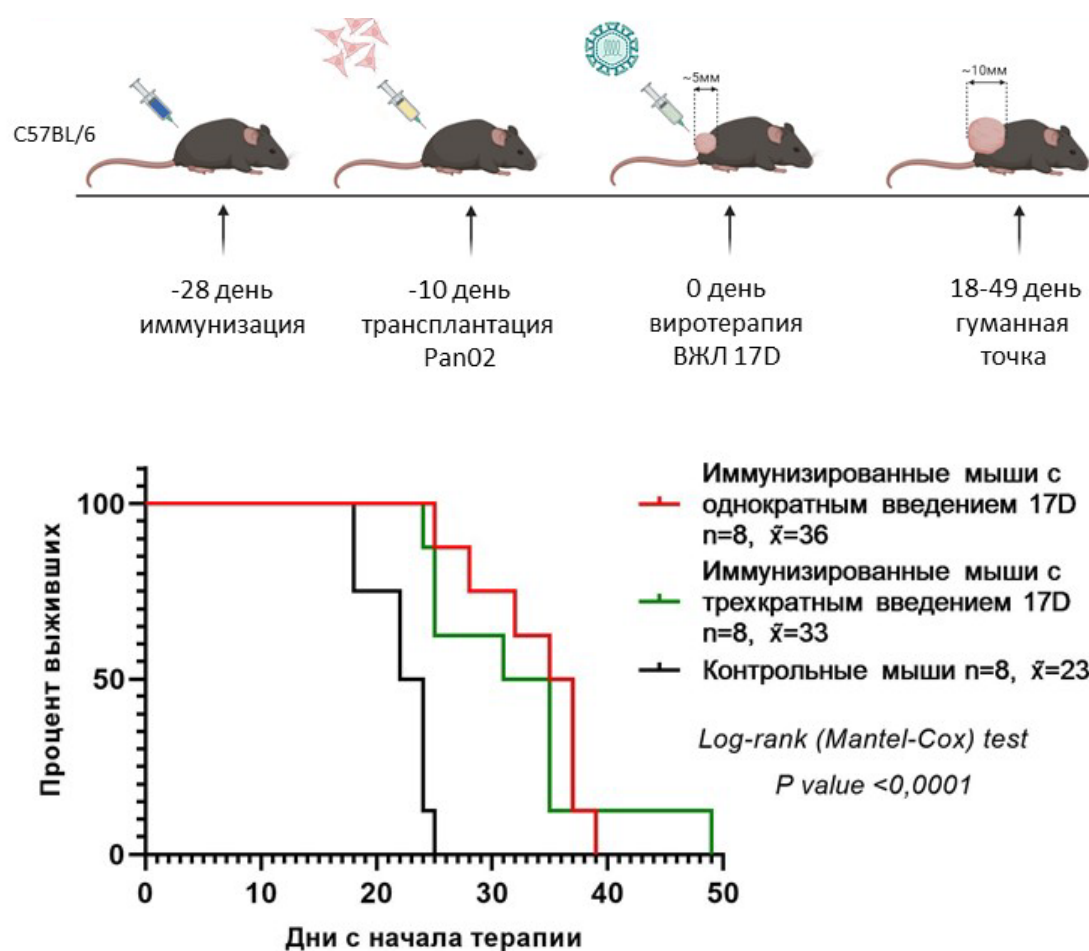


Рисунок 1 - Анализ выживаемости Каплана-Мейера иммунизированных мышей C57BL/6 с виротерапией в сингенной модели Pan02

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (госзадание) «Изучение патогенного и онколитического потенциала вируса клещевого энцефалита, возбудителей других трансмиссивных инфекций и их рекомбинантных производных» № FNZG-2024-0003.

Литература:

1. Трачук К.Н., Пестов Н.Б., Бирюкова Ю.К., Колясникова Н.М. Влияние врожденного иммунного ответа на эффективность действия онколитических вирусов. Вопросы вирусологии. 2024. Т. 69. № 6. С. 479-488. DOI: 10.36233/0507-4088-275.
2. Nazarenko, A.S.; Biryukova, Y.K.; Trachuk, K.N.; et al. Immunotherapeutic

Potential of the Yellow Fever Virus Vaccine Strain 17D for Intratumoral Therapy in a Murine Model of Pancreatic Cancer. *Vaccines* 2025, 13, 40. <https://doi.org/10.3390/vaccines13010040>.

ОЦЕНКА ПЕРЕКРЕСТНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА КАНДИДАТНЫХ ВАРИАНТОВ мРНК-ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Никифорова М.А., Клейменов Д.А., Гущин В.А.

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения

e-mail: marianikiforova@inbox.ru

ASSESSMENT OF THE CROSS-REACTIVE IMMUNE RESPONSE OF mRNA VACCINES AGAINST TICK-BORNE ENCEPHALITIS

Nikiforova M.A., Kleymenov D.A., Gushchin V.A

N.F. Gamalei Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health Russian Federation, Moscow, Russia

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) генетически неоднороден и представлен тремя основными субтипами (генотипами) – дальневосточный, европейский и сибирский, а также другими генетическими вариантами, обладающими свойствами субтипов – байкальский, 178-79, гималайский. На сегодняшний день, при отсутствии специфической противовирусной терапии, вакцинопрофилактика является наиболее надежным и эффективным способом профилактики заболевания клещевым энцефалитом (КЭ). Существующие инаktivированные цельновирioнные вакцины демонстрируют высокую иммуногенность, но не обеспечивают 100% защиту против гетерологичных штаммов вируса. Заболеваемость клещевым энцефалитом в эндемичных районах

растёт, а географическое распространение инфекции ВКЭ расширяется как в России, так и в других странах [1-3]. Ежегодно среди вакцинированных лиц регистрируют случаи заболевания КЭ [4, 5]. Также вызывает озабоченность продолжительность защиты, формируемая после иммунизации. Технология мРНК-вакцин открывает новые возможности для создания вакцин, способных индуцировать широкий перекрестный иммунный ответ против различных генетических вариантов вируса, что является ключевым аспектом в свете популяционной изменчивости микроорганизмов. В нашем исследовании мы сосредоточились на возможности создания кандидатных вакцинных препаратов на основе мРНК-технологии.

В рамках разработки мРНК-вакцины были созданы 10 вариантов вакцинных препаратов, содержащих в своем составе различные геноварианты ВКЭ и проведено исследование по оценке перекрестной иммуногенности. Иммуногенность оценивали на модели линейных мышей BALB/c (n=10 в группе). Животные были иммунизированы внутримышечно двумя дозами вакцины с интервалом в 14 дней. Через 4 недели после иммунизации были получены сыворотки животных и проведена оценка способности сывороток нейтрализовать разные субтипы ВКЭ *in vitro*.

Показано, что иммунизация мышей препаратами mRNA-PrM/E-TBEV приводила к образованию нейтрализующих антител. Иммуногенность и широта перекрестной вируснейтрализующей активности в отношении разных геновариантов ВКЭ зависит от состава (антигена) в конструкции мРНК-вакцины. В результате исследования был определен кандидатный препарат mRNA-PrM/E-2, показавший наибольшую эффективность как по спектру, так и по уровню перекрестной вируснейтрализующей активности (Рисунок 1).

Полученные данные подтверждают перспективность платформы мРНК-вакцин для создания профилактических препаратов нового поколения против изменчивых патогенов, таких как вирус клещевого энцефалита.

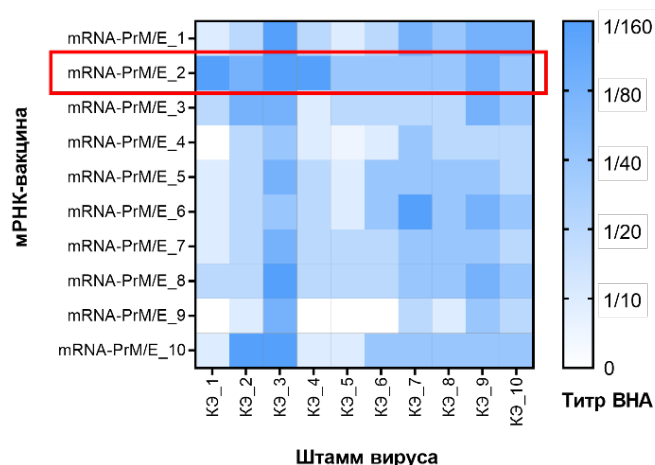


Рисунок 1 - «Тепловая карта» значений титра вируснейтрализующей активности (ВНА) сывороток

*Работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения
(государственное задание № 125021902438-1).*

Литература

1. Deviatkin A.A., Kholodilov I.S., Belova O.A., Bugmyrin S.V., Bespyatova L.A., Ivannikova A.Y., Vakulenko Y.A., Lukashev A.N., Karganova G.G. Microorganisms. 2020. Vol. 8. P. 1589.
2. Sharova A.A., Tokarevich N.K., Baimova R.R., Freylikhman O.A., Karmokov I.A., Riabiko E.G., Lunina G.A., Buzinov R.V., Sokolova O.V., Buts L.V. PLoS One. 2025. Vol. 20.
3. Esser H.J., Lim S.M., de Vries A., Sprong H., Dekker D.J., Pascoe E.L., Bakker J.W., Suin V., Franz E., Martina B.E.E. Emerg. Infect. Dis. 2022. Vol. 28. P. 2416–2424.
4. Penyeyskaya N.A., Rudakov N.V., Rudakova S.A. Epidemiol. Vakcinoprofil. LLC Nomicom. 2018. Vol. 17. P. 78-88.
5. Stiasny K., Holzmann H., Heinz F.X. Vaccine. 2009. Vol. 27. P. 7021-7026.

БИОПОДОБНЫЕ ИНДУЦИРОВАННЫЕ МИКРОВЕЗИКУЛЫ: НОВАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВАКЦИН ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Ризванов А.А., Шкайр Л., Гаранина Е.Е., Хайбуллина С.Ф.,

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, институт фундаментальной медицины и биологии, НИЛ «OpenLab Генные и клеточные технологии»

e-mail: rizvanov@gmail.com

BIO-INSPIRED INDUCED MICROVESICLES: A NEW PLATFORM FOR VACCINE DEVELOPMENT AGAINST INFECTIOUS DISEASES

Rizvanov A.A., Shkair L., Garanina E.E., Khaiboullina S.F.

Kazan (Volga Region) Federal University

Вакцинная доставка антигенов с использованием внеклеточных везикул рассматривается как перспективное направление, позволяющее повышать иммуногенность и биодоступность антигенов при хорошей переносимости. Биоподобные индуцированные микровезикулы (иМВ), полученные обработкой продуцентных клеток цитохалазином В, сохраняют бислойную мембрану и набор рецепторов, способны переносить белки и нуклеиновые кислоты и отличаются высоким выходом, биосовместимостью и простотой очистки по сравнению с экзосомами [1-2].

Цель работы: Оценить иммуногенные свойства иМВ, содержащих структурные белки ортохантавируса Пуумала (PUUV), и возможность формирования гуморального и клеточного иммунного ответа на модели мышей С57В1/6 [3–5].

Материалы и методы: Мезенхимные стволовые клетки мыши трансдуцировали лентивирусными векторами, кодирующими гены нуклеокапсида (N) и гликопротеина (Gn/Gc) PUUV; иМВ получали обработкой цитохалазином В, выделяли и очищали дифференциальным центрифугированием [3–5].

Структуру и размер иМВ оценивали ТЭМ; присутствие N и Gc подтверждали иммуноблоттингом. Доставку белков тестировали на клетках A549. Состав цитокинов/хемокинов в иМВ и сыворотках определяли мультиплексным анализом (xMAP Luminex) [3–5].

Иммунизацию проводили подкожно (15 мкг белка/мышь, n=8 в группе); антитела выявляли ИФА; Т-клеточный ответ IFN- γ ELISpot по набору пептидов N-белка; статистическую значимость оценивали ANOVA, $p < 0,05$ [3–5].

Результаты: Полученные иМВ имели округлую морфологию и размер 100–1000 нм; в их составе определялись белки PUUV N (≈ 50 кДа) и Gc (≈ 56 кДа). иМВ эффективно переносили N и Gn/Gc в клетки A549 *in vitro* [3].

В составе иМВ, несущих PUUV-белки, обнаружены повышенные концентрации IL-2, IL-6, IL-13, IL-17A, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL1, GM-CSF и TNF- α ; после иммунизации у животных отмечали изменения сывороточных цитокинов (в т. ч. повышение IL-6, G-CSF, GM-CSF) [3]. Через 14 и 28 суток зарегистрировано достоверное увеличение титров IgG к антигенам ортохантавирусов; набор иммуногенных пептидов N варьировал по времени, устойчиво реагировали участки N6 (101–125 aa.) и N22 (419–433 aa.) [3–5]. ELISpot зафиксировал активацию цитотоксических Т-клеток при стимуляции пептидами нуклеокапсида, расположенными в (241–255, 281–295, 419–433 aa), а также пептидами гликопротеина, расположенными в (51–65, 431–445, 811–825 aa); пептид N25 (241–255 aa) индуцировал ответ CD8⁺Т-клеток памяти [3]. Отмечена перекрёстная реактивность сывороток к пептидам N родственных ортохантавирусов (HTNV, DOBV, ANDV) [4–5].

Закключение: иМВ на основе МСК, несущие белки PUUV, обладают собственными адъювантными свойствами (цитокиновая «сопровождающая нагрузка») и индуцируют выраженный гуморальный и клеточный ответ в модели мышей, включая формирование памяти CD8⁺Т-клеток. Платформа иМВ представляется перспективной для создания многокомпонентных вакцин против геморрагической лихорадки с почечным синдромом и других зоонозных инфекций [1–5].

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проекты № 19-74-00113; № 22-44-02007), программ 5-100 и «Приоритет-2030».

Литература:

1. Gomzikova M.O., Aimaletdinov A.M., Bondar O.V., Starostina I.G., Gorshkova N.V., Neustroeva O.A., Kletukhina S.K., Kurbangaleeva S.V., Vorobev V.V., Garanina E.E., Persson J.L., Jeyapalan J., Mongan N.P., Khaiboullina S.F., Rizvanov A.A. Induced microvesicles as a new vector for drug delivery. Scientific Reports. 2020. T.10, Вып.1. С. 10740.
2. Shkair L., Garanina E.E., Stott R.J., Foster T.L., Rizvanov A.A., Khaiboullina S.F. Membrane Microvesicles as Potential Vaccine Candidates. International Journal of Molecular Sciences. 2021. T. 22 Вып.3. С. 1142.
3. Shkair L., Garanina E.E., Martynova E.V., Kolesnikova A.I., Arkhipova S.S., Titova A.A., Rizvanov A.A., Khaiboullina S.F. Immunogenic Properties of MVs Containing Structural Hantaviral Proteins: An Original Study. Pharmaceutics. 2022. T. 14. С. 93.
4. Shkair L., Garanina E.E., Rizvanov A.A. The efficacy of a microvesicle-based vaccine in eliciting a humoral immune response against orthohantavirus nucleocapsid peptides. Current Trends in Immunology. 2022. T. 23. С. 53–67.
5. Shkair L., Sharma D., Hamza S., Garanina E., Shakirova V., Khaertynova I., Markelova M., Pavelkina V., Rizvanov A., Khaiboullina S., Baranwal M., Martynova E. Cross-reactivity of hantavirus antibodies after immunization with PUUV antigens. Biotechnol Appl Biochem. 2024. T.71. С. 1139–1153.

**ИММУНОГЕННЫЕ И ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ВЕКТОРА НА
ОСНОВЕ AD19, НЕСУЩЕГО ДВА ГЕНА ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА
ГРИППА А И В**

Чугунова А.С., Голдовская П.П., Попова О., Зубкова О.В., Щебляков Д.В.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный
исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного
академика Н.Ф.Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской
Федерации*

e-mail: a.s.chugunova@mail.ru

**IMMUNOGENIC AND PROTECTIVE PROPERTIES OF THE AD19-BASED
VECTOR CARRYING TWO HEMAGGLUTININ GENES OF INFLUENZA
VIRUS A AND B**

Chugunova A.S., Goldovskaia P.P., Popova O., Zubkova O.V., Shcheblyakov D.V.

*Federal State Budget Institution “National Research Centre for Epidemiology and
Microbiology named after Honorary Academician N F Gamaleya” of the Ministry of
Health of the Russian Federation*

В условиях постоянно возникающей опасности эпидемий различных заболеваний необходимы новые решения в создании эффективных вакцин. Рекомбинантные аденовирусные векторы (Ad) являются популярным инструментом для доставки генов в клетки млекопитающих, в частности при разработке вакцинных препаратов [1]. Актуальной тенденцией на сегодняшний день является использование в качестве технологических платформ типов аденовирусов, альтернативных Ad5 [2]. Вектор на основе Ad19 является перспективным благодаря своей схожести с хорошо изученным Ad26, который характеризуется высокой репродуктивной способностью и клинической эффективностью. Интересной стратегией с точки зрения технологического производства является использование одного аденовирусного вектора, несущего одновременно два разных антигена.

В связи с этим целью данной работы было получение аденовируса

человека 19-го типа, несущего сразу два гемагглютинины вирусов гриппа А и В, и исследование его эффективности.

В результате данной работы был получен репликативно-дефектный вектор на основе Ad19, экспрессирующий гемагглюнины вирусов гриппа H1N1 и B/Victoria lineage (рис.1А).

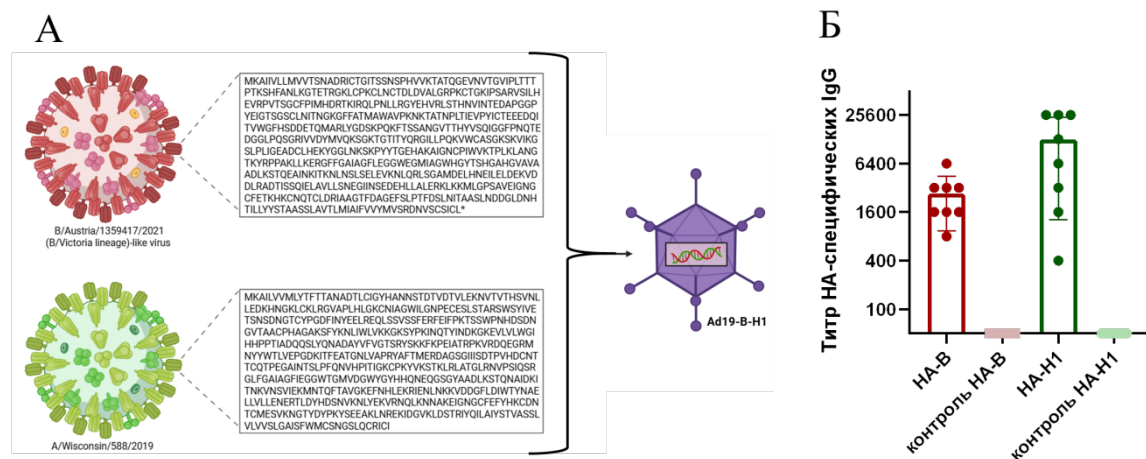


Рисунок 1 - А) Получение Ad19-B-H1; Б) Титр гемагглютинин-специфических антител у мышей, иммунизированных Ad19-B-H1. Обозначено среднее геометрическое, 95% доверительный интервал

Индукцию гуморального иммунного ответа изучали при однократном внутримышечном введении Ad19-B-H1 лабораторным животным в дозе 10^{10} вирусных частиц. Показано, что Ad19-B-H1 способен формировать антиген-специфический иммунный ответ к каждому из гемагглютининов: среднее геометрическое титра IgG, специфичных к гемагглютинуину вируса гриппа H1N1 (A/Wisconsin/588/2019) составило 1:6400, среднее геометрическое титра IgG, специфичных к гемагглютинуину вируса гриппа В (B/Austria/1359417/2021) составило 1:2263.

Оценку протективности проводили на модели летальной инфекции. Мышей в/м иммунизировали Ad19-B-H1, через 28 дней и/н заражали вирусом A/Victoria/2570/2019 (H1N1) в дозе 10 ЛД₅₀ (рис. 2). Начиная с 3-го дня, контрольные (невакцинированные) животные стремительно теряли вес, регистрировали клинические признаки инфекции и гибель всех животных к 8

дню. В группе мышей, иммунизированных Ad19-B-H1, среднее значение потери веса не превышало 10%, не зарегистрировано симптомов гриппозной инфекции и гибели животных. Следовательно, Ad19-B-H1 способен индуцировать выработку протективного иммунного ответа, обеспечивающего эффективную защиту от гриппозной инфекции.

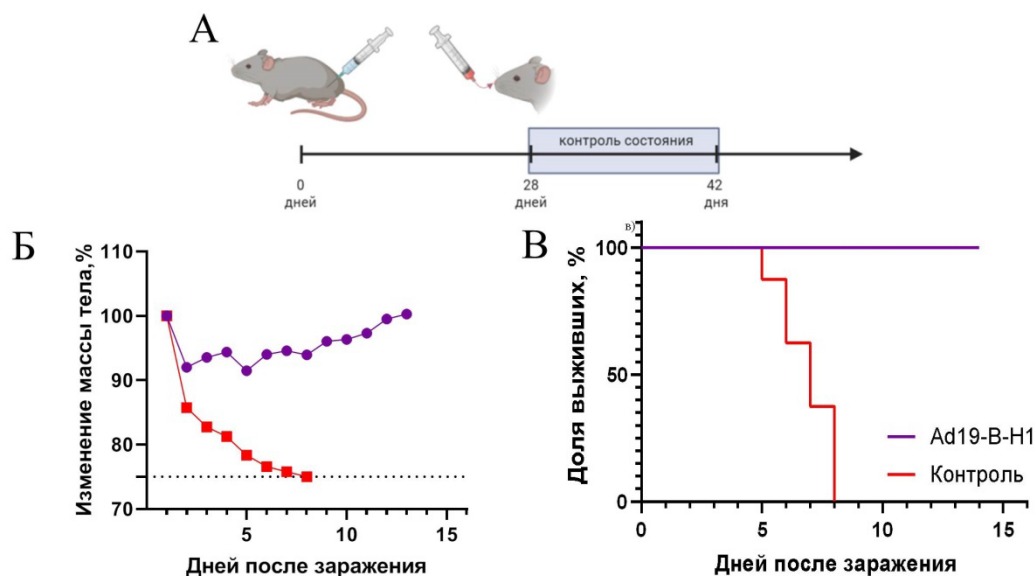


Рисунок 2 - А) Схема эксперимента по выживаемости мышей; Б) График изменения веса у мышей, зараженных вирусом гриппа (H1N1); В) График выживания мышей после заражения вирусом гриппа (H1N1)

Таким образом, впервые был создан вектор на основе Ad19, экспрессирующий гены гемагглютинаина вирусов гриппа А и В. Мультицистронный аденовирусный вектор способен индуцировать гуморальный иммунный ответ и обеспечивать защиту мышей от летальной гриппозной инфекции. Примечательно, что данная конструкция позволит значительно сократить затраты при производстве.

Литература:

1. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyrshina A.V., Lubenets N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A.,

Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S. et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. Lancet. 2021 Feb 20;397(10275):671-681.

2. Hongbo Zhang, Hongdan Wang, Youcai An, Ze Chen Construction and application of adenoviral vectors // Molecular Therapy. - 2023. - №34

СОЛИ ИМИДАЗОЛИЯ КАК ВОЗМОЖНАЯ ОСНОВА ДЛЯ НОВЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Кабанова А.А.^{1,2}, Нарыкина А.И.², Белоусова З.П.²

¹*ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет»*

Министерства здравоохранения РФ, кафедра фундаментальных дисциплин

Международного института.

²*ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени
академика С.П. Королёва»*

e-mail: aakurilova95@yandex.ru

IMIDAZOLIUM SALTS AS A POTENTIAL BASIS FOR NOVEL ANTIBACTERIAL DRUGS

Kabanova A.A.^{1,2}, Narykina A.I.², Belousova Z.P.²

¹*FSBEI HE «Samara State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the
Russian Federation*

²*Samara National Research University*

Быстрый рост резистентности микроорганизмов к антибиотикам признан одной из глобальных проблем[1]. Способом решения проблемы антибиотикорезистентности может стать синтез новых антибактериальных и антифунгальных веществ. Такими соединениями могут стать ароматические гетероциклы, для которых предполагается воздействие на несколько «мишеней» бактериальной клетки, в связи с чем ожидается низкая вероятность формирования устойчивости к ним среди бактерий [2]. К перспективным гетероциклическим соединениям относится имидазол. Цель исследования – синтез и изучение антибактериального действия новой соли имидазолия (1,3-дидодецил-2,4-диметил-1Н-имидазол-3-ий бромид).

Для получения соли имидазолия была применена методика синтеза в один этап, где соотношение исходного 2,4-диметилимидазола и додецил бромида 1:2

при 100°C при интенсивном перемешивании в ацетонитриле в течение 6 часов. Реакционную смесь промывали диэтиловым эфиром. Полученное вещество сушили в течение 24 часов. Структуру подтверждали методами инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье, данными элементного анализа; чистоту - методом тонкослойной хроматографии. Антибактериальную активность образцов определяли методом Кирби-Бауера [3] с использованием *E.coli* M17, *S. aureus* ATCC 6538P (209-P) и *A. fumigatus* KM8001 (исследование антифунгальных свойств). Эффективность соединений оценивали по величине зон отсутствия роста микроорганизмов. Результаты исследования представлены на Рисунке 1 и 2.

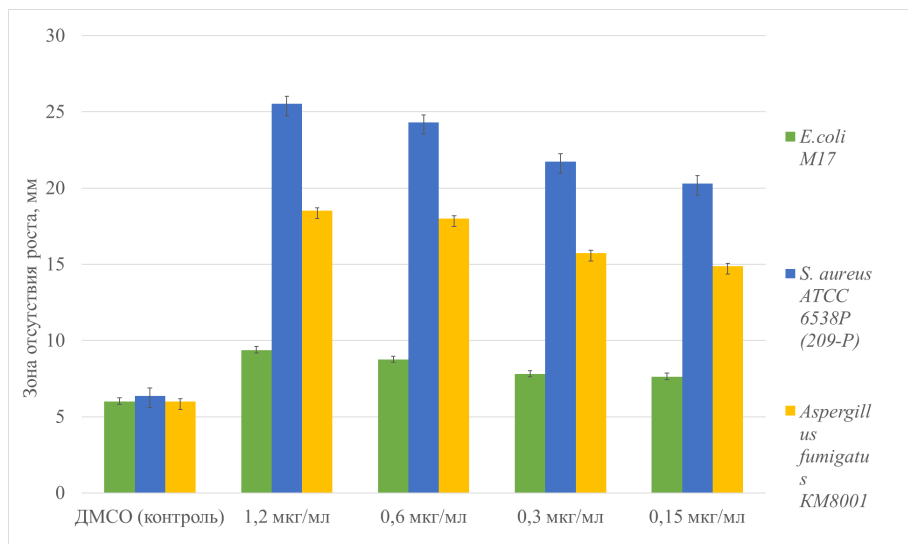


Рисунок 1 - Исследование антибактериальной и антифунгальной активности новой соли диско-диффузным методом

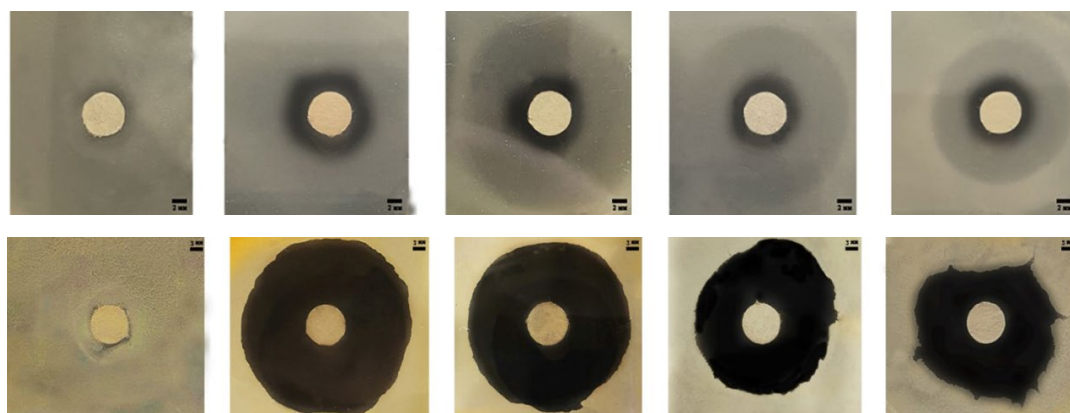


Рисунок 2 - Зоны отсутствия роста для различных концентраций полученной соли (слева направо от 1,2 мкг/мл до 0,15 мкг/мл); сверху – для *E.coli* M17; снизу – для *S. aureus* ATCC 6538P (209-P)

Проводили определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) исследуемого вещества методом серийных разведений в бульоне [4]. В результате исследований установлена высокая чувствительность исследуемых штаммов (высокие показатели зоны отсутствия роста). МИК для *E.coli* M17 и *S. aureus* ATCC 6538P (209-P) также подтверждают, что микроорганизмы являются чувствительными к синтезированному соединению (значения МИК < 1 мкг/мл). На основании полученных результатов можно сделать вывод, что синтезированное соединение обладает значительным антибактериальным и антифунгальным эффектом.

Работа выполнена при поддержке «Фонд поддержки молодых ученых имени Геннадия Комиссарова».

Литература:

- 1.Kamat S., Kumari M. Emergence of microbial resistance against nanoparticles : Mechanisms and strategies // Front. Microbiol. 2022. Vol. 14. P. 1102615.
- 2.Izabelle M. Dicationic imidazolium-based ionic liquids: a new strategy for non-toxic and antimicrobial materials/M.Izabelle, D. A. Siddiqui, P.Bhardwaj, L.C. Rodriguez [et al.]// RSC Adv. Royal Society of Chemistry, 2014. Vol. 4. P. 62594–62602.
- 3.Gefen O. TDtest : easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay/O.Gefen, B. Chekol1, J. Strahilevitz,N. Q. Balaban//Scientific reports.- 2017. №7. P. 41284.
- 4.Kadeřábková N., Mahmood A.J.S., Mavridou D.A.I. Antibiotic susceptibility testing using minimum inhibitory concentration (MIC) assays // Antimicrob. Resist. 2024. Vol. 2, № 37.

**ПОЛИАЗОТИСТЫЕ ГЕТЕРОЦИКЛЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ
ИНГИБИТОРЫ РЕГУЛЯТОРОВ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА**

Миколайчук О.В.^{1,2}, Шемчук О.С.^{1,2}, Протас А.В.^{1,2}, Попова Е.А.^{1,2},

Шаройко В.В.², Семенов К.Н.², Молчанов О.Е.¹, Майстренко Д.Н.¹

*^aПервый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, Российская Федерация, 197022, Санкт-Петербург, ул.*

Льва Толстого, 6-8

^bРоссийский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад.

А. М. Гранова Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Российская Федерация, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул.

Ленинградская, 70

e-mail: olgamedchem@gmail.com

**POLYNITROGEN HETEROCYCLES AS PROMISING INHIBITORS OF
CELL CYCLE REGULATORS**

Mikolaichuk O.V.^{1,2}, Shemchuk O.S.^{1,2}, Protas A.V.^{1,2}, Popova E.A.^{1,2},

Sharoyko V.V.², Semenov K.N.², Molchanov O.E.¹, Maistrenko D.N.¹

A.M. Granov Russian Research Centre for Radiology and Surgical Technologies,

Leningradskaya str., 70, St. Petersburg, 197758, Russia

Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 6–8 L'va Tolstogo Str., St.

Petersburg, 197022, Russia

Ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) — это класс препаратов, используемых для лечения ряда распространённых злокачественных новообразований, включая рак молочной железы, толстой кишки, лёгких и поджелудочной железы [1]. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) включает четыре различных белка со схожими структурными характеристиками: EGFR (HER1/ErbB1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) и ErbB4 (HER4). При этом стоит отметить, что примерно 20% диагностированных впервые случаев рака молочной железы обусловлены гиперэкспрессией гена ErbB2 [2].

В данной работе синтезированы и охарактеризованы новые производные

морфолин-4-ил-1,3,5-триазина и 4-метилпиперазин-1-ил-1,3,5-триазина, содержащие в 1,3,5-триазиновом цикле в качестве заместителей 5-арилтетразолильный, 5-метил-1*H*-тетразол-1-илацетогидразидный и 5-фенил-2*H*-тетразол-2-илацетогидразидный фрагменты. Методом МТТ-теста исследована цитотоксическая активность полученных соединений в отношении опухолевых клеточных линий Huh-7 и A549 [3].

Для соединений, показавших наибольшее цитотоксическое действие, методом УФ-спектроскопии изучено взаимодействие с ДНК, изучена способность ингибировать тирозинкиназный домен поверхностных трансмембранных рецепторов клеток линии Huh-7 – EGFR и Her-2 методом иммуноблоттинга.

Литература:

1. Yamaoka T., Ohba M., Ohmori T. Molecular-Targeted Therapies for Epidermal Growth Factor Receptor and Its Resistance Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 2017. T. 18. C. 2420;
2. Sharma B., Singh V.J., Chawla P.A. Epidermal growth factor receptor inhibitors as potential anticancer agents: An update of recent progress. *Bioorganic Chem.* 2021. T. 116. C. 105393;
3. Mykolaichuk O.V., Protas A.V., Popova E.A., Lutsev M.D., Smirnov E.Y., Golotin V.A., Ostrovsky V.A., Korniyakov I.V., Semenov K.N. Synthesis and study of some properties of new tetrazole-containing derivatives of morpholin-4-yl-1,3,5-triazine and 4-methylpiperidin-1-yl-1,3,5-triazine // *Žurnal obšej himii.* - 2023. T. 93, Вып. 5. C. 695-710.

**ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛИМЕРНОГО СОЕДИНЕНИЯ
В КАЧЕСТВЕ АНТИСЕПТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА**

**Нечаева О.В.^{1,2}, Тихомирова Е.И.³, Шнайдер Д.А.⁴, Заярский Д.А.⁵,
Нестерова Т.Б.⁴**

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства,
гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава
России

²ФГБОУ ДПО "Российская медицинская академия непрерывного
профессионального образования" Минздрава России

³ФГБОУ ВО «Саратовский государственный технический университет имени
Гагарина Ю.А.»

⁴ГУЗ «Саратовский областной клинический кожно-венерологический
диспансер»

⁵ООО НПО «Константа»

e-mail: olgav.nechaeva@mail.ru

RATIONALE FOR USING A POLYMER COMPOUND AS AN ANTISEPTIC

**Nechaeva O.V.^{1,2}, Tikhomirova E.I.³, Schnaider D.A.⁴, Zayarsky D.A.⁵, Nesterova
T.B.⁴**

¹*Federal State Budgetary Institution "National Medical Research Center of
Obstetrics, Gynecology, and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov" of
the Ministry of Health of the Russian Federation*

²*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education
"Russian Medical Academy of Continuous Professional Education" of the Ministry of
Health of the Russian Federation*

³*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Saratov State
Technical University named after Yu.A. Gagarin"*

⁴*State Health Institution "Saratov Regional Clinical Dermatovenerologic
Dispensary"*

⁵ООО НПО "Konstanta"

Рост устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к антимикробным препаратам является глобальной медико-биологической проблемой [1]. Поэтому одним из актуальных и востребованных направлений в современной фармакологии является разработка и внедрение новых антимикробных препаратов. В качестве перспективной группы химических соединений рассматриваются биосовместимые полимеры, обладающие антимикробной активностью, применение которых позволяет получать удобные формы действующих веществ, сохранять их стабильность в условиях макроорганизма, создавать депо препарата, а также обеспечивать низкий уровень токсичности [2]. Одним из соединений, отвечающих данным требованиям, является полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода (ПААГ-М) (ООО НПО «Константа», г. Саратов).

Цель исследования – изучить спектр антимикробной активности и безопасность ПААГ-М и обосновать возможность его использования в медико-биологической практике.

Антимикробную активность ПААГ-М и водных дисперсий наночастиц серебра и золота, стабилизированных полимером, в отношении стандартных и клинических штаммов условно-патогенных бактерий и грибов определяли методом серийных разведений. Антибиопленочную активность полимера изучали в отношении монокультур и полимикробных биопленок в лунках полистироловых планшетов. Исследование токсичности исследуемых препаратов проводили на лабораторных животных.

Проведенные исследования показали, что ПААГ-М характеризовался широким спектром антимикробной активности в отношении стандартных и клинических штаммов условно-патогенных бактерий и дрожжевых грибов, а также их биопленочных форм. Значения минимальной подавляющей концентрации (МПК) в отношении грамположительных бактерий – *S. aureus* составили 4 мкг/мл, грамотрицательных бактерий – *P. aeruginosa* и *E. coli* – 8 мкг/мл, а минимальная фунгицидная концентрация в отношении дрожжевых грибов *C. albicans* – 32 мкг/мл. Хотя биоцидные концентрации для

грамотрицательных бактерий и дрожжевых грибов были достаточно высокими, что, вероятно связано с особенностями строения их клеточной стенки, однако эти показатели были значительно ниже, чем у большинства коммерческих антимикробных средств.

Оценка антибиопленочной активности ПААГ-М позволила установить, что обработка лунок иммунологических планшетов сублетальными концентрациями полимера приводила к выраженному нарушению процесса пленкообразования всеми исследованными стандартными и клиническими штаммами микроорганизмов, что выражалось в снижении интенсивности связывания красителя и снижении оптической плотности. Полученные результаты позволяют рассматривать исследуемое полимерное соединение в качестве эффективного антибиопленочного средства для обработки изделий медицинского назначения. Это было подтверждено на модели уретрального катетера, опытные образцы которого предварительно обработанного ПААГ-М. Методами сканирующей электронной микроскопии было установлено, что все исследуемые микроорганизмы через 24 часа культивирования формировали микробные биопленки с интенсивно выраженным экзополимерным матриксом. Обработка фрагментов катетеров полимерным соединением приводила к нарушению процесса пленкообразования, что проявлялось во фрагментации микробных биопленок или их полному отсутствию в поле зрения образца, а также нарушению формирования матрикса на поверхности отдельно локализованных микробных клеток.

Исследование противовирусной активности полимера показало, что ПААГ-М ингибировал репродукцию штамма «ВН-96» вируса ТГЭС, поскольку в предварительно обработанном препаратами монослое культуры клеток СПЭВ-б, зараженных вирусом, отсутствовало цитопатическое действие, и клетки сохраняли свои исходные морфологические характеристики.

Еще одним походом к преодолению антибиотикорезистентности микроорганизмов является модификация антимикробных препаратов, наиболее часто применяемых в медицинской и ветеринарной практике с помощью

биологически-активных веществ. В своих исследованиях мы предприняли попытку разработать эффективную комбинацию сублетальных концентраций антибиотика и полимерного соединения ПААГ-М с целью восстановления чувствительности полирезистентного клинического штамма *P. aeruginosa* к антибактериальным препаратам, который исходно обладал устойчивостью представителям β -лактамных антибиотиков и промежуточной – к полимиксину В. Сочетанное действие сублетальных концентраций антибиотика и ПААГ-М приводило к восстановлению чувствительности клинического штамма к меропенему, цефепиму и полимиксину В. Однако наибольшая эффективность в восстановлении чувствительности бактерий была достигнута при воздействии на микробные клетки сублетальных концентраций ПААГ-М, что способствовало проявлению чувствительности ко всем исследуемым β -лактамным антибиотикам. Вероятно, это достигается благодаря воздействию полимерного соединения на поверхностные структуры микробных клеток, что приводит к повышению их проницаемости и облегчает проникновение антибиотиков и связывание их с мишенями.

Тестирование полимера по показателям острой токсичности позволило отнести ПААГ-М к IV классу токсичности, поскольку для него не удалось определить показатели LD₅₀.

Таким образом, полученные результаты позволяют рассматривать ПААГ-М в качестве эффективного и безопасного биоцидного компонента при разработки антимикробных лекарственных препаратов.

Литература:

1. Almutairy B. Front. Microbiol. 2024. V. 15. P. 1381511.
2. Zhu Q. et al. RSC Adv. 2024. V. 14. P. 18519-18527.

**НОВЫЕ БЕНЗОАЗАКРАУН-ЭФИРЫ С КОМБИНИРОВАННЫМИ
ХЕЛАТИРУЮЩИМИ ГРУППАМИ КАК ХЕЛАТОРЫ ДЛЯ ^{64}Cu , ^{210}Pb и
 ^{177}Lu**

Пашанова А.В.¹, Зубенко А.Д.¹, Замуруева Л.С.^{1,2}, Литвиненко Е.А.^{1,2}

¹*Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова,
Лаборатория по разработке хелаторов и их конъюгатов с молекулами-
векторами для получения радиофармпрепаратов*

²*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова*

e-mail: 1404an99@mail.ru

**NEW BENZOAZACROWN ETHERS WITH COMBINED CHELATING
GROUPS AS CHELATORS FOR ^{64}Cu , ^{210}Pb AND ^{177}Lu**

Pashanova A.V.¹, Zubenko A.D.¹, Zamurueva L.S.^{1,2}, Litvinenko E.A.^{1,2}

¹*A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement compounds of Russian Academy of
Sciences, Laboratory for the development of chelators and their conjugates with
vector molecules for the production of radiopharmaceuticals*

²*Department of chemistry, Lomonosov Moscow State University*

Комплексообразующие свойства азакраун-соединений вызывают большой интерес у современных исследователей. Известно, что для создания комплексонов, способных эффективно связывать катионы металлов, необходимо введение дополнительных хелатирующих групп [1]. Наиболее широко используются карбоксильные, пиколиновые и пиридинные группы. Комбинируя разные типы координирующих групп в одной структуре, можно настраивать свойства лиганда под конкретный катион металла. В связи с этим, целью данной работы является получение нового типа бензоазакраун-соединений, содержащих комбинацию двух различных типов хелатирующих групп в макроцикле и изучение влияния этих групп на комплексообразование с медицинскими катионами Cu^{2+} , Pb^{2+} и Lu^{3+} методами потенциометрического титрования, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии (Рисунок 1).

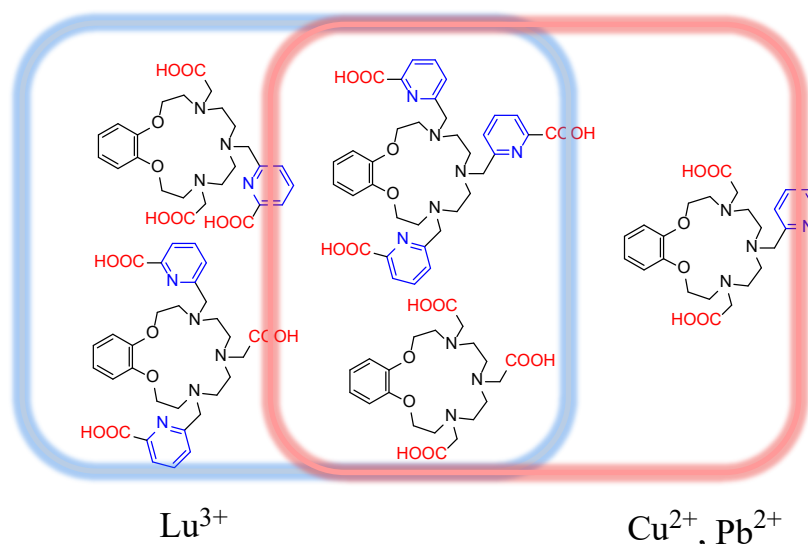


Рисунок 1 - Синтез бензоазакраун-эфиров

Установлено, что все полученные соединения эффективно связывают изученные катионы металлов в водном растворе. Для комплекса $^{210}\text{Pb}\cdot\text{ВАРy2A}$ и $^{64}\text{Cu}\cdot\text{ВАРy2A}$ была проведена серия радиохимических исследований. Показано, что $>95\%$ катиона связывается менее чем за минуту при комнатной температуре. В исследованиях меченых соединений *in vitro* установлена устойчивость комплексов к перехелатированию и переметаллированию.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ № 23-13-00424.

Литература:

1. Egorova B.V., Zamurueva L.S., Zubenko A.D. et al. *Molecules*, **2022**, 27, 3115.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛ-3-КИНАЗЫ (PI3K) НА ОСНОВЕ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ ТРИАЗИНОВОГО РЯДА: МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ, СИНТЕЗ

Скрыльникова М.А., Петухова Н.В., Молчанов О.Е., Гранов Д.А.,

Майстренко Д.Н.

*ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова», отдел фундаментальных исследований
e-mail: mari954@mail.ru*

POTENTIAL INHIBITORS OF PHOSPHATIDYLINOSITOL-3-KINASE (PI3K) BASED ON NITROGEN-CONTAINING HETEROCYCLES OF THE TRIAZINE SERIES: MOLECULAR DOCKING, SYNTHESIS

Skrylnikova M.A., Petukhova N.V., Molchanov O.E., Granov D.A.,

Maistrenko D.N.

A.M. Granov Russian Research Centre for Radiology and Surgical Technologies

Ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) играют ключевую роль в современной онкологии, особенно при лечении рака молочной железы [1]. Перспективными соединениями для разработки новых цитостатических агентов являются производные 1,3,5-триазины, способные избирательно связываться с каталитическими доменами киназ, включая PI3K, и блокировать их активность [2]. Наибольшую ингибирующую активность демонстрируют соединения, содержащие морфолиновый фрагмент, а также азотистый гетероцикл (1,2,4-триазол и тетразол). Такие производные представляют интерес для создания таргетных противоопухолевых препаратов.

Исследование связывания ряда целевых 1,3,5-триазинов (Рисунок 1) с PI3K проводилось с использованием программного пакета Schrödinger molecular modeling suite (version 2022-1) (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022), что позволило определить наиболее перспективные лиганды с высокой аффинностью к активному центру фермента.

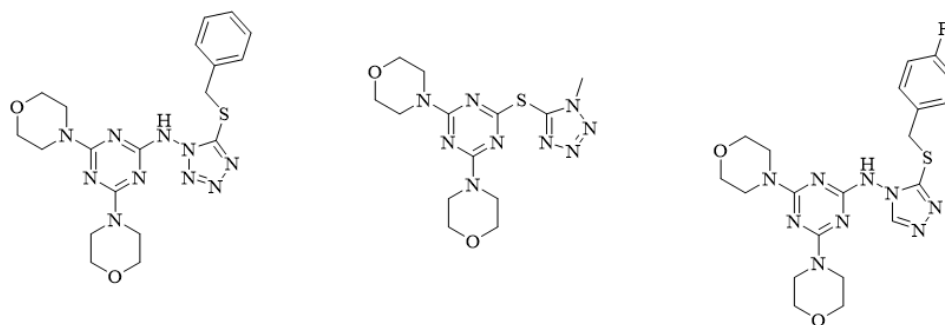


Рисунок 1 - Исследуемые производные 1,3,5-триазина

Синтез потенциально активных соединений осуществлялся с применением классических методов органического синтеза. Особое внимание уделялось повышению выходов целевых продуктов, которые составили 70-80%.

Полученные данные позволяют рекомендовать их для исследований *in vitro* на противоопухолевую активность.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения РФ (ГЗ: «Создание таргетного препарата из группы селективных ингибиторов фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) на основе азотсодержащих гетероциклов пиримидинового и триазинового ряда, а также родственных им соединений, для лечения больных с диссеминированными формами солидных опухолей», ЕГИСУ: 1024021500062-3-3.2.21;3.1.5;1.6.4).

Литература

1. Fruman, D.A.; Chiu, H.; Hopkins, B.D.; Bagrodia, S.; Cantley, L.C.; Abraham, R.T. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell* 2017, 170, 605–635, doi:10.1016/j.cell.2017.07.029.
2. Lim, H.Y.; Dolzhenko, A. V. 1,3,5-Triazine as a Promising Scaffold in the Development of Therapeutic Agents against Breast Cancer. *Eur J Med Chem* 2024, 276, 116680, doi:10.1016/j.ejmech.2024.116680.

РАЗРАБОТКА ХЕЛАТОРОВ НА ОСНОВЕ ПИРИДИН-ДИАЗАКРАУН-ЭФИРА ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО СВЯЗЫВАНИЯ КАТИОНОВ СВИНЦА

Тарасенко О.В.^{1,2}, Щукина А.А.¹, Зубенко А.Д.¹, Иконникова И.С.³

¹*Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской Академии Наук, Лаборатория по разработке хелаторов и их конъюгатов с молекулами-векторами для получения радиофармпрепаратов*

²*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, кафедра химии и технологии биомедицинских препаратов*

³*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра радиохимии*

e-mail: taraseoksana@yandex.ru

DEVELOPMENT OF PYRIDINE-DIAZACROWN-ETHER BASED CHELATORS FOR EFFICIENT LEAD CATION BINDING

Tarasenko O.V.^{1,2}, Shchukina A.A.¹, Zubenko A.D.¹, Ikonnikova I.S.³

¹*A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of the Russian Academy of Sciences*

²*D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia*

³*Lomonosov Moscow State University*

Одним из современных методов диагностики и терапии рака является использование радиофармпрепаратов (РФП), которые представляют собой прочные комплексы лигандов с ионами радионуклидов, пришитые посредством линкера к векторной биомолекуле.

Цель данной работы – разработка хелаторов для эффективного связывания катионов свинца. Выбранная тема является актуальной, так как изотопы свинца доступны в производстве, используются в диагностике и при терапии онкологических заболеваний. Pb^{2+} имеет большой радиус (0.98-1.49 Å), и обладает высоким сродством к лигандам, содержащим кислород или азот [1], поэтому объектом исследования был выбран пиридин-дiazакраун-эфир, в который вводились различные по природе хелатирующие группы (схема 1).

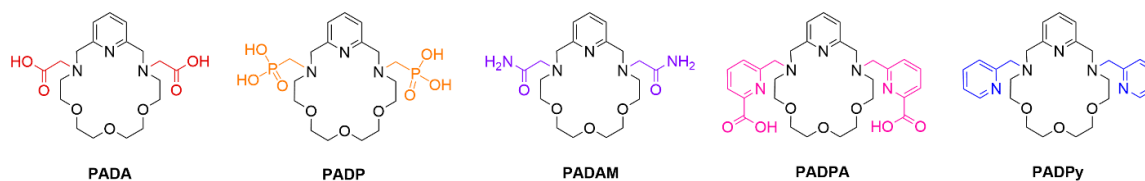


Схема 1. Синтезированные хелаторы

Изучение комплексообразования методом ЯМР-спектроскопии показало образование комплексов с жесткой структурой для всех изучаемых лигандов. Полученные масс-спектры подтвердили образование комплексных соединений в соотношении $M:L=1:1$. Мечение лигандов проходит в мягких условиях с высокими выходами. Исследование устойчивости комплексов с Pb^{2+} в сыворотке белков крови показало практически полное отсутствие перехелатирования для **PADA** и **PADPA** в течение суток. Также наблюдалось выведение из организма комплекса лиганда **PADPA** со свинцом при изучении биораспределения *in vivo* в течение 6 часов. Таким образом, пиколинатное производное **PADPA** является наиболее перспективным для разработки радиофармпрепарата для радионуклидов свинца.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ №23-13-00424.

Литература:

1. A. Ingham, T. Kostelnik, B. McNeil, C. Orvig. Dalton Trans. 2021. 50. 11579.

**РАЗРАБОТКА РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ С АКТИНИЕМ-225 ДЛЯ
ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ**

***Тищенко В.К.¹, Власова О.П.^{1,2}, Вирясов М.Б.^{2,3}, Рыжикова Т.П.¹,
Дороватовский С.А.¹, Степченкова Е.Д.¹, Остроухов А.А.¹, Щербакова А.Н.¹,
Федорова А.В.¹, Чибисова О.Ф.¹, Шегай П.В.^{1,2,4}, Иванов С.А.^{1,5},
Каприн А.Д.^{2,4,5}***

¹ *Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ
«НМИЦ радиологии» Минздрава России*

² *ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии»
Минздрава России*

³ *НИИ Физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского МГУ*

⁴ *Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А.
Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр радиологии» Минздрава России*

⁵ *ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
e-mail: vikshir82@mail.ru*

**THE DEVELOPMENT OF RADIOPHARMACEUTICALS LABELLED
WITH ACTINIUM-225 FOR CANCER THERAPY**

***Tishchenko V.K.¹, Vlasova O.P.^{1,2}, Viryasov M.B.^{2,3}, Ryzhikova T.P.¹,
Dorovatovskiy S.A.¹, Stepchenkova E.D.¹, Ostroukhov A.A.¹, Shcherbakova A.N.¹,
Fedorova A.V.¹, Chibisova O.F.¹, Shegai P.V.^{1,2,4}, Ivanov S.A.^{1,5}, Kaprin A.D.^{2,4,5}***

¹ *A. Tsyb Medical Radiological Research Centre – branch of the National Medical
Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation*

² *National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the
Russian Federation*

³ *A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology MSU*

⁴ *P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical
Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation*

⁵ *Peoples Friendship University of Russia (RUDN University)*

Актуальность. Онкологические заболевания остаются серьезной медицинской проблемой из-за неуклонного роста заболеваемости и смертности. Специфические рецепторы, гиперэкспрессированные на клеточной мембране опухолевых клеток, обеспечивают молекулярную основу селективной радионуклидной терапии с применением радиофармацевтических лекарственных препаратов (РФЛП). Одним из наиболее перспективных терапевтических радионуклидов является ^{225}Ac ($T_{1/2} = 9,9$ сут). ^{225}Ac распадается с испусканием четырех альфа-частиц (E_α от 5,8 МэВ до 8,4 МэВ) и двух бета-частиц (диапазон энергий от 0,6 до 1,6 МэВ) [1]. Альфа-частицы обладают высокой линейной передачей энергии в совокупности с коротким пробегом в тканях ($< 0,1$ мм), что способствует эффективному уничтожению опухолевых клеток за счет индукции летальных двухцепочечных разрывов ДНК с минимальным лучевым воздействием на здоровые ткани.

Цель. Разработка отечественных радиофармацевтических лекарственных препаратов (РФЛП) на основе радионуклида актиния-225 (^{225}Ac) для терапии злокачественных новообразований.

Материалы и методы. Для разработки РФЛП использовался ^{225}Ac в виде раствора хлорида актиния-225 (АО «ГНЦ РФ – ФЭИ») и химические предшественники пептидной природы (АО «Фарм-Синтез»). В качестве вспомогательных компонентов и реактивов были использованы: аскорбиновая кислота (Sigma-Aldrich, США), гидроксид натрия (Sigma-Aldrich, США), ацетат натрия (neoFroxx, Германия), ДТПА (Merck, Германия), натрия цитрат дигидрат, аммония ацетат (Компонент-Реактив, Россия), трис (Диаэм, Россия) и др. Качество полученных РФЛП оценивали по следующим параметрам: внешний вид, pH и радиохимическая чистота (РХЧ). Радиохимическую чистоту (РХЧ) полученных комплексов определяли методом ТСХ с использованием пластин TLC Silica gel 60 на алюминиевой подложке (Merck, Германия) и ТСХ бумаги Whatman-1 (Cytiva, США).

Результаты. В МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиале ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России был разработан РФЛП с ^{225}Ac для терапии

метастатического кастрат-резистентного рака предстательной железы на основе низкомолекулярного ингибитора простат-специфического мембранного антигена (ПСМА). РФЛП представляет собой прозрачный, слегка желтоватый раствор, без механических включений, pH 5,7. РХЧ препарата превышает 95%. Проведены доклинические исследования РФЛП ^{225}Ac -DOTA-ПСМА. В настоящее время проводится 1 фаза клинических исследований.

На сегодняшний день завершена разработка РФЛП ^{225}Ac -DOTA-TATE – препарата для терапии нейроэндокринных опухолей с гиперэкспрессией соматостатиновых рецепторов. Были определены оптимальные условия радиохимического синтеза ^{225}Ac -DOTA-TATE: концентрация пептида (100 мкг), температура нагрева (95 °C), pH (5,8-5,9) реакционной смеси. Проводятся доклинические исследования РФЛП.

Также проведена фармацевтическая разработка РФЛП на основе вещества Р (substance Р) и актиния-225 (^{225}Ac -DOTA-SP) для радионуклидной терапии глиом. Были подобраны оптимальные условия для синтеза РФЛП: pH (6,5-7,5), время нагрева промежуточного раствора (14-16 мин), температура нагрева (90-95 °C). РХЧ готовой лекарственной формы РФЛП был выше 95% на протяжении 5 ч с момента изготовления. Препарат имел прозрачный, слегка желтоватый вид без видимых механических включений

Выводы. Полученные результаты демонстрируют возможность создания РФЛП, меченных ^{225}Ac , с высоким выходом и оптимальным биораспределением *in vivo*.

Исследование частично (в части разработки РФЛП ^{225}Ac -DOTA-TATE) выполнено при финансовой поддержке Минздрава России (государственное задание № 124030500022-1).

Литература:

1. Hooijman EL, Radchenko V., Ling SW, Konijnenberg M, Brabander T, Koolen SLW, de Blois E. Implementing Ac-225 labelled radiopharmaceuticals: practical considerations and (pre-)clinical perspectives. EJNMMI Radiopharm. Chem. 2024. V. 9. P. 9.

СИНТЕЗ НОВЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АГОНИСТОВ

РЕЦЕПТОРА ГПП-1 НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ 1H-

БЕНЗИМИДАЗОЛА И 4H-ТРИАЗОЛ-3-ИЛБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ

Толкачева Е.В., Салахов Т.Л., Салиев А.Ю., Краснодубец А.М., Иванов Р.А.,

Чернышов В.В.

АНОО ВО Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр

трансляционной медицины

e-mail: all.tired@yandex.ru

SYNTHESIS OF NEW LOW MOLECULAR WEIGHT AGONISTS OF THE

GLP-1 RECEPTOR BASED ON DERIVATIVES OF 1H-BENZIMIDAZOLE

AND 4H-TRIAZOLE-3-ILBENZOIC ACID

Elena V. Tolkacheva, Alexandr Yu. Saliev, Tagir L. Salakhov, Roman A. Ivanov

and Vladimir V. Chernyshov

Sirius University of Science and Technology

Новым классом сахароснижающих препаратов являются агонисты рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (аГПП-1Р), которые в том числе снижают массу тела¹. На фармацевтическом рынке доступны пептидные аГПП-1Р, обладающие низкой биодоступностью при пероральном применении и имеющие ряд побочных эффектов. Низкомолекулярные аГПП-1Р способны преодолеть эти недостатки, однако, в настоящий момент времени, ни один из них не был одобрен к применению.

Для дизайна новых потенциальных низкомолекулярных аГПП-1Р в настоящей работе был выбран Дануглипрон (Pfizer, 2018, рис. 1а), от разработки которого компания отказалась в 2025 году. В ходе исследований получено два хемотипа аГПП-1Р: на основе 1H-бензимидазола и 4H-триазол-3-илбензойной кислоты (см. рис. 1а)^{2,3}. Функциональную активность в отношении рецептора ГПП-1 (ГПП-1Р) оценивали по накоплению цАМФ (см. рис 1б) с использованием репортерной клеточной линии HEK293T-CREluc-GLP1R-GFP (НТУ Сириус), в качестве препарата сравнения использовали Дануглипрон (PF-06882961,

Selleckchem, США). Показано, что все полученные соединения обладают целевой активностью в отношении ГПП-1Р в микромолярном диапазоне концентраций, что говорит о необходимости дальнейшей работы по поиску соединения-лидера в рамках разработанных хемотипов.

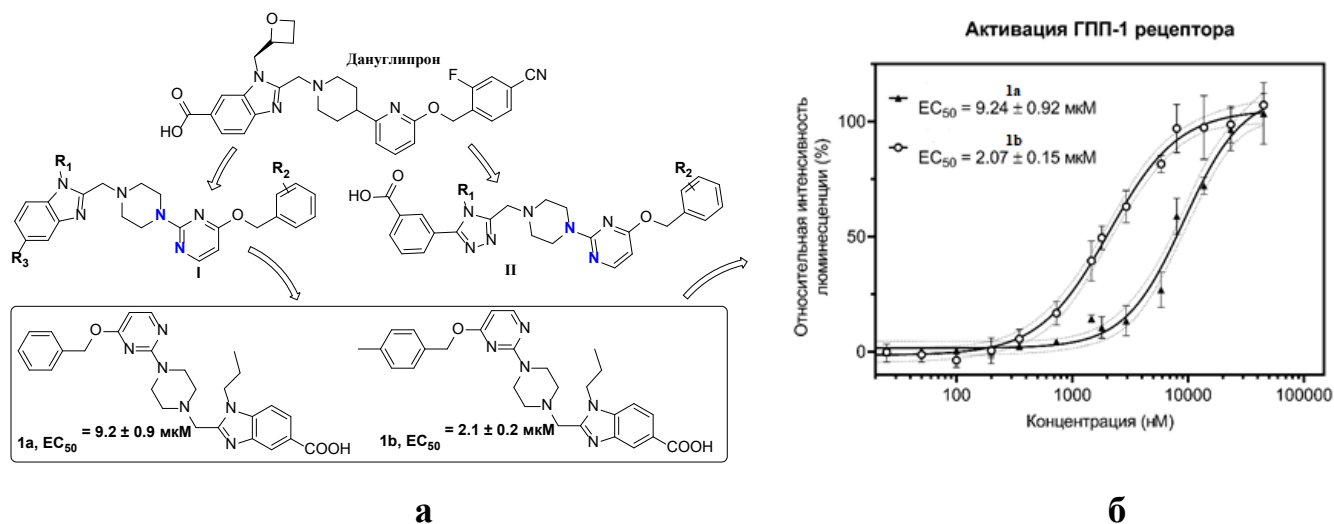


Рисунок 1: а – Структура Дануглипрона, общие структуры I, II (двух разработанных хемотипов, соответственно), примеры полученных соединений и значений их полумаксимальных эффективных концентраций (EC₅₀)^{2,3}; б – Репрезентативные графические кривые активации ГПП-1Р агонистами 1a и 1b²

Литература

1. Tolkacheva E.V., Saliev A.Yu., Salakhov T.L., Balakin K.V., Ivanov R.A., Chernyshov V.V. Current Medicinal Chemistry, 2025.
2. Толкачева Е.В., Салахов Т.Л., Салиев А.Ю., Краснодубец А.М, Иванов Р.А., Чернышов В.В. Патент RU 2838323 С1, 2025.
3. Толкачева Е.В., Салиев А.Ю., Салахов Т.Л., Краснодубец А.М, Иванов Р.А., Чернышов В.В. Заявка на патент. Регистрационный №2024137618, входящий №W24083321, приоритет по дате поступления 13.12.2024 г.

**СИНТЕЗ НОВЫХ ГУАНИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АДЕНИНА
- ИНГИБИТОРОВ НАТРИЙ-ВОДОРОДНОГО ОБМЕННИКА ПЕРВОГО
ТИПА (NHE-1)**

Финагеева М.О.

*ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»,
кафедра Фармацевтической и токсикологической химии, фармакогнозии и
ботаники*

e-mail: mari.tuzhikova@inbox.ru

***SYNTHESIS OF NEW GUANIDINE DERIVATIVES OF ADENINE,
INHIBITORS OF THE FIRST TYPE OF SODIUM-HYDROGEN EXCHANGER
(NHE-1)***

Finageeva M. O.

*The Volgograd State Medical University of Public Health Ministry of the Russian
Federation*

e-mail: mari.tuzhikova@inbox.ru

Введение: В связи с недостаточно высокой клинической эффективностью используемых в России кардио- и нейропротективных лекарственных препаратов, актуальным направлением является поиск и исследование мало изученной группы - ингибиторов NHE-1. Соединения с такой фармакологической активностью обладают цитопротекторным действием, защищая клетки миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения. Ранее была отмечена корреляция между фармакологической активностью и химической структурой и выявлено, что большая часть известных ингибиторов NHE-1, в том числе Зонипорид, содержит фрагмент гуанидина в своей структуре. В связи с этим, разработка новых соединений - ингибиторов NHE-1 на основе N9-гуанидиновых производных аденина является актуальной.[1-3]

Цель и задачи:

Целью данного исследования является оценка возможности создания новых лекарственных средств на основе гуанидиновых производных аденина.

В процессе исследования были решены следующие задачи:

1. Изучение литературы и поиск зависимости структура – фармакологическая активность;
2. Разработка методик синтеза промежуточных и конечных соединений на основе молекул аденина;
3. Постановка синтеза промежуточных и конечных соединений с использованием разработанной методики;
4. Очистка полученных соединений;
5. Проверка чистоты соединений, определение физических свойств и спектральное подтверждение структуры;
6. Определение фармакологической активности.

Материалы и методы: Разработка синтеза, синтез и исследование фармакологической активности N9-гуанидиновых производных аденина осуществлялись в Научном центре инновационных лекарственных средств ВолгГМУ. Структура синтезированных соединений подтверждена данными ЯМР-спектроскопии, состав - масс-спектрами высокого разрешения, чистота и индивидуальность - хроматографическими методами. Фармакологическая активность изучена *in vitro* на тромбоцитах кролика. Исследования проведены в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и ГОСТ 33044-2014 и с соблюдением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях».

Результаты: Новые соединения были получены алкилированием сложными бензиловыми эфирами бромуксусной и бромпропионовой кислоты с последующим аминированием полученных N9-замещенных сложноэфирных производных аденина гуанидином и аминоксидом. Очистка соединений была осуществлена перекристаллизацией с подбором растворителей. Общий выход промежуточных и конечных соединений достигал 80%, а чистота веществ составляла > 95% по данным ТСХ. ЯМР-спектроскопия показала сигналы, характерные функциональным группам веществ (^1H , ^{13}C). Были описаны

физические свойства веществ и измерена температура плавления. После проведенного фармакологического скрининга *in vitro* на тромбоцитах кролика было отмечено, что синтезированные соединения, в особенности производные аминогуанидина, демонстрируют выраженную способность ингибировать NHE-1.

Выводы: Опираясь на полученные результаты можно судить о правильности разработки методики и ее воспроизводимости. Новые гуанидиновые производные аденина являются потенциальными активными фармацевтическими субстанциями для дальнейшей разработки на их основе высокоэффективных отечественных лекарственных средств.

Литература:

1. Финагеева, М.О. Новые гуанидиновые производные аденина / М.О. Финагеева // Сборник статей Региональной научно-практической конференции для аспирантов и соискателей. – Волгоград, 2025. – С. 100-102
2. Петров, В.И., Основные результаты доклинического изучения таблеток 9-[2-(4-изопропилфенокс)этил]аденина, обладающего психотропной активностью / АА. Озеров, М. С. Новиков, Э.Ф. Степанова, Л.А. Смирнова, И.Н. Тюренков, Л.И. Бугаева, В.В. Багметов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований - 2015. - № 11. - С. 719-721.
3. Spasov, A., Synthesis and multifaced pharmacological activity of novel quinazoline NHE-1 inhibitors / A. Ozerov, P. Vassiliev, V. Kosolapov, N. Gurova, A. Kucheryavenko, L. Naumenko, D. Babkov, V. Sirotenko, A. Taran, R. Litvinov, A. Borisov, V. Klochkov, D. Merezhkina, M. Miroshnikov, G. Uskov, N. Ovsyankina // Scientific Reports. - 2021. - Vol. 11. - Article No. 24380

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ
ТРАНСКРИПЦИОННО АКТИВНОГО ХРОМАТИНА В ЯДРАХ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ
РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

***Яшина Е. Г.^{1,2}, Варфоломеева Е. Ю.¹, Пантина Р. А.¹, Байрамуков В. Ю.¹,
Ковалев Р. А.¹, Федорова Н. Д.¹, Горшкова Ю. Е.³, Григорьев С. В.¹***

*¹Петербургский институт ядерной физики имени Б. П. Константинова НИЦ
Курчатовский институт, Санкт-Петербург*

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

³Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

e-mail: yashina_91@inbox.ru

***STUDY OF THE STRUCTURAL ORGANISATION OF THE
TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE CHROMATIN IN TUMORCELL NUCLEI BY
SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING***

***E.G. Iashina^{1,2}, E.Yu. Varfolomeeva¹, R.A. Pantina¹, V.Yu. Bayramukov¹, R.A.
Kovalev¹, N.D. Fedorova¹, K.A. Pshenichny¹, Yu.E. Gorshkova³, S.V. Grigoriev¹***

*¹Petersburg Nuclear Physics Institute named after B.P. Konstantinov
of National Research Centre “Kurchatov Institute”, Gatchina*

²Saint Petersburg State University

³Joint Institute for Nuclear Research, Dubna

Одним из наиболее информативных и востребованных методов определения структуры неупорядоченных биологических объектов является малоугловое рассеяние рентгеновского излучения (МУРР). Эксперименты по МУРР на ядрах опухолевых клеток HeLa демонстрируют наличие фрактальной структуры размером в 200 нм и фрактальной размерностью $D=2,6$ [1, 2]. В то время как эксперименты по МУРР на ядрах опухолевых клеток HeLa с подавленной транскрипционной активностью двумя разными способами (культивирование в условиях дефицита питательной среды и культивирование с добавлением ингибитора транскрипции актиномицина Д), в обоих случаях

демонстрируют отсутствие объемнофрактальной струкутры, вместо которой наблюдаются наличие 20-30 нанометровых петель нуклеосомной фибриллы, которые можно визуализировать с помощью программного пакета Atsas 3.3[3].

Исследование организации хроматина в ядрах нормальных клеток лимфоцитов крысы (низкая транскрипция) и ядрах линии опухолевых лимфоцитов NC-37 (высокая транскрипция) также демонстрируют наличие фрактальной структуры размером в 100 нм и с фрактальной размерностью $D=2.5$ в ядрах опухолевых клеток, и ее отсутствие в ядрах нормальных клеток.

Таким образом, высокая транскрипционная активность хроматина, характерная для опухолевых клеток связана с наличием фрактальной структуры в ядре, а метод МУРР является хорошим инструментом для исследования структурных изменений в хроматине под воздействием веществ, влияющих на активность генов на эпигенетическом уровне (в т. ч. противоопухолевых препаратов).

Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 20-12-00188).

Литература:

- [1] Iashina, E. G., et al., *Journal of Applied Crystallography*, 52(4), 844-853 (2019).
- [2] Grigoriev, S. V., et al., *Physical Review E*, 104(4), 044404 (2021).
- [3] Яшина Е. Г., и др., *Письма в ЖЭТФ*, 118(10), 776 – 781 (2023).

**РАЗРАБОТКА СТИМУЛОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ *IN SITU* СИСТЕМ
НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ:
МЕТОДОЛОГИЯ И РЕАЛИЗАЦИЯ**

Бахрушина Е.О.

*ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет),
Институт фармации имени А.П. Нелюбина, кафедра фармацевтической
технологии*

e-mail: bakhrushina_e_o@staff.sechenov.ru

**DEVELOPMENT OF STIMULUS-SENSITIVE IN SITU SYSTEMS FOR
TARGETED DRUG DELIVERY: METHODOLOGY AND
IMPLEMENTATION**

Bakhrushina E.O.

*FSBEI HE I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of
Health of the Russian Federation (Sechenov University), A.P. Nelyubin Institute of
Pharmacy*

Сегодня с активным внедрением новых технологий на первый план выходит разработка систем доставки лекарств, обеспечивающих большую биодоступность, таргетное высвобождение действующего вещества, больший комплаенс пациентов или другие преимущества. Одним из наиболее динамично развивающихся направлений в области создания систем направленной доставки, является разработка стимулочувствительных *in situ* систем доставки лекарств, под которыми понимают системы доставки, совершающие фазовый переход в определенном дизайном месте. С точки зрения физико-химических свойств такие системы рассматриваются как реверсивные системы, золь-гель переход которых осуществляется локально под действием термических, химических или физико-химических факторов, определяемых физиологическими условиями места

применения. В зависимости от рода стимула, потенцирующего фазовый переход, матрицы *ISS* можно разделить на фазочувствительные, термочувствительные, pH-чувствительные, ион-селективные, влагоактивизируемые и фотоактивизируемые.

In situ формы могут найти широкое применение во многих областях клинической практики. На 2025 год зарегистрировано более 50 клинических исследований на системы доставки препаратов *in situ*. Преимуществами, обеспечивающими стабильный интерес к данным системам со стороны клиники, являются простота введения ЛП в жидкой форме, хорошее распределение, высокое удерживание на слизистой за счет гелевой формы и повышенной мукоадгезии, длительность экспозиции – с увеличением полноты высвобождения АФИ и пролонгацией эффекта. Разнообразие формируемых *in situ* форм – гелей, имплантатов, эмульсий, пленок – дает возможность получения дополнительных преимуществ при использовании их в различных медицинских областях.

При этом, основным препятствием к обширному внедрению подобных систем в клиническую практику является отсутствие четкого методологического подхода к проведению разработки, сформированного с учетом современных требований к качеству препарата, закладываемого на этапе проектирования состава, которое зачастую приводит к неудовлетворительным результатам при попытке регистрации и вывода на рынок в качестве лекарственных препаратов *in situ* систем, благополучно прошедших клинические исследования.

В ходе проведенных собственных исследований и изучения опубликованных данных разработаны методологические подходы к созданию термочувствительных, фазочувствительных, ионселективных и pH-чувствительных *in situ* систем. В основе универсальной части методологии, релевантной для систем любого стимула, лежат характеристики вводимых активных ингредиентов и места введения, напрямую влияющие на выбор матрицы стимулочувствительной системы. Для эффективного выбора матрицы, обусловленного соответствием характеристик полимерной композиции закладываемым дизайном критическим параметрам, проанализированы

основные сочетания доступных полимеров, названные «базой термочувствительных матриц» и «базой ионселективных матриц» (при разработке средств, соответствующих стимулов). Из пула композиций, входящих в базы, возможен упрощенный выбор матрицы, обладающей необходимыми характеристиками. Полученная таким образом стимулочувствительная система доставки проходит скрининг по критическим параметрам (термочувствительные: температура фазового перехода, время гелеобразование, рН, пластическая вязкость до и после фазового перехода, мукоадгезия, высвобождение [1,2,3]; фазочувствительные: инъектируемость, время инверсии фаз, механическая прочность, время деградации, высвобождение [4]; ионселективные: селективность гелеобразования, вязкость до и после фазового перехода, мукоадгезия, высвобождение [5]; рН-чувствительные: селективность гелеобразования, время гелеобразования, мукоадгезия, рН, вязкость до и после фазового перехода, высвобождение [6]), контроль которых ведется с установленной кратностью в период не менее 48 недель [3].

В процессе разработки термочувствительных рН-чувствительных, ионселективных, фазочувствительных *in situ* систем для офтальмологического, интравагинального, интравентрикулярного, стоматологического и интраназального применения на основе проанализированной литературы и собственных экспериментальных данных составлены целевые профили качества, выделены критические факторы, лежащие в основу скрининговых параметров разработки стимулочувствительных препаратов для различного применения. В зависимости от формы введения, среди этих параметров выделяются инъектируемость, стерильность, прочность образующегося имплантата или вязкость образующегося геля, площадь распределения по модельной слизистой и процент удерживания (невытекания), высвобождение через 3 и 8 часов – и другие параметры [1-6].

Внедрив предложенные методологические подходы и разработанные методики скрининга *in situ* систем в фармацевтическую разработку, были разработаны стабильные технологические цепочки для получения

лекарственных средств «Цефуроксим, термочувствительный имплантат 1 мг/мл», «Цефуроксим–ТД, термочувствительный имплантат 1 мг/мл» [2], «Хлоргексидина биглюконат, термочувствительный вагинальный гель 15 мг/мл», «Лидокаина гидрохлорид, термочувствительный гель 20 мг/мл», «Кеторолака трометамин, стоматологический имплантат, 90 мг», «Рибавирин, термочувствительный интраназальный гель, 10 мг/мл» [6].

Литература:

1. Bakhrushina E.O. Gels. 2023. Vol.9. №9. P.693.
2. Bakhrushina E.O. Gels. 2023. Vol. 9. №7. P.508.
3. Bakhrushina E.O., Saudi Pharmaceutical Journal. 2023. Vol.31. №10. P.101780.
4. Bakhrushina E.O. Pharmaceutics. 2024. №16. P.115.
5. Bakhrushina E.O. Polymers. 2024. №16. P.685.
6. Бахрушина Е.О. БЭБМ. 2022. Т.174. №9. С. 324–328

АЭРОЗОЛЬНАЯ ТРАНСФЕКЦИИ КЛЕТОК ЛЕГОЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПУТЕМ ОСАЖДЕНИЯ ЗАРЯЖЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК В ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ.

Вакарина Л.Д.¹, Антонова О.Ю.², Тайлаков М.Е.², Канев И.Л.²

¹Пуцинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», г. Пушкино, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт теоретической и экспериментальной биофизики

РАН, г. Пушкино, Россия

e-mail: liya.vakarina@mail.ru, 4kanev@gmail.com

AEROSOL TRANSFECTION OF PULMONARY EPITHELIAL CELLS BY DEPOSITION OF CHARGED PLASMID DNA NANOPARTICLES IN AN ELECTRIC FIELD.

L.D. Vakarina¹, O.Y. Antonova², M.E. Taylakov², I.L. Kanev²

*¹Pushchino Branch of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Russian Biotechnological University (BIOTECH University)»,
Pushchino, Russia*

²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushchino, Russia

Цель. Изучение возможности проведения трансфекции клеток на границе раздела жидкость-воздух путем осаждения аэрозольной формы плазмидной ДНК с добавлением трансфецирующего агента на основе катионных липидов на поверхность клеточной мембраны.

Актуальность. Наноаэрозоли являются перспективным методом доставки препаратов для таргетной генной терапии заболеваний лёгких благодаря возможности создания высокой локальной концентрации препарата в тканях лёгкого, снижению дозы и минимизированию системного воздействия на организм.

Методы. Аэрозольная форма плазмиды получена методом электрораспыления с частичной газофазной нейтрализацией [1,2]. Осаждение аэрозоля проводилось в течение 5 минут на монослой клеток в системе «легкое-на-чипе» с возможностью приложения направленного электрического поля для ускорения осаждения аэрозоля [3]. Концентрацию аэрозоля измеряли в пьезобалансном анализаторе для измерения массовой концентрации аэрозолей (модель 3521, KANOMAX, Япония). Графики, демонстрирующие спектры частиц, а также численную концентрацию и средние диаметры аэрозольных наночастиц были получены с помощью диффузионного аэрозольного спектрометра DAS-2702 (AeroNanoTech, Россия). В качестве генетического вектора использована плазида pmKate2-f-mem (4800 п.о., Eurogen, Россия), кодирующая красный флуоресцентный белок. В качестве трансфецирующего

агента использован GenJect40 (Молекта, Россия). В качестве модели легочного эпителия использованы клетки линии аденокарциномы легких человека A549. Анализы эффективности трансфекции и цитотоксичности после осаждения аэрозоля проведены методом флуоресцентной микроскопии.

Результаты. Получен и охарактеризован наноаэрозоль, полученный распылением раствора плазмидной ДНК с добавлением трансфецирующего агента GenJect40. Распределение размеров аэрозольных частиц представлено на рисунке 1. Методом электрофореза в агарозном геле продемонстрировано сохранение целостности структуры плазмиды после аэрозолизации. Аэрозоль демонстрирует низкую цитотоксичность при осаждении на монослой клеток в модели «лёгкое-на-чипе» (доля живых клеток через 96 часов после осаждения составила $99\pm 1\%$). Наноаэрозольная форма плазмиды при осаждении в течение 5 минут на клеточный слой демонстрирует значительный уровень трансфекции: доля клеток, экспрессирующих флуоресцентный белок через 96 часов после осаждения, составила $66\pm 10\%$. В предварительных опытах было показано, что за 5 минут на каждую клетку оседает примерно 10^3 копий плазмиды.

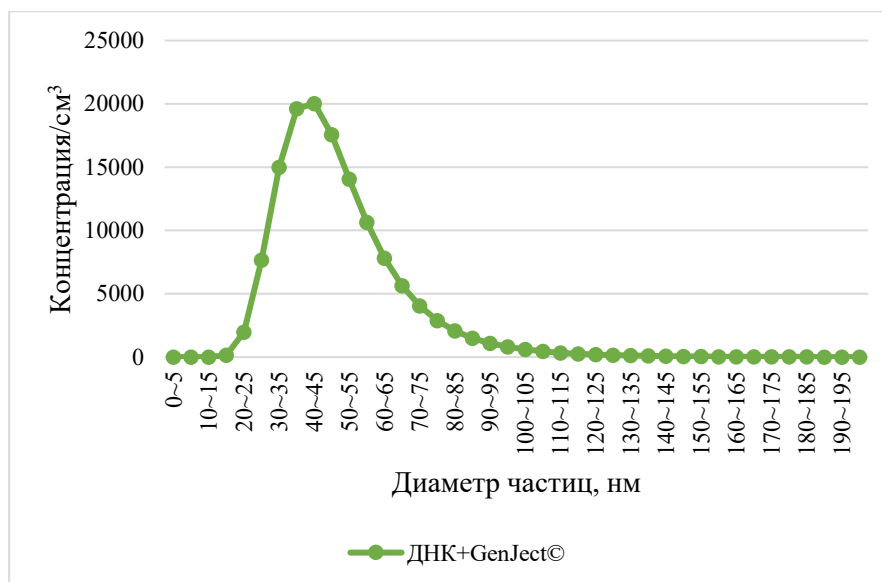
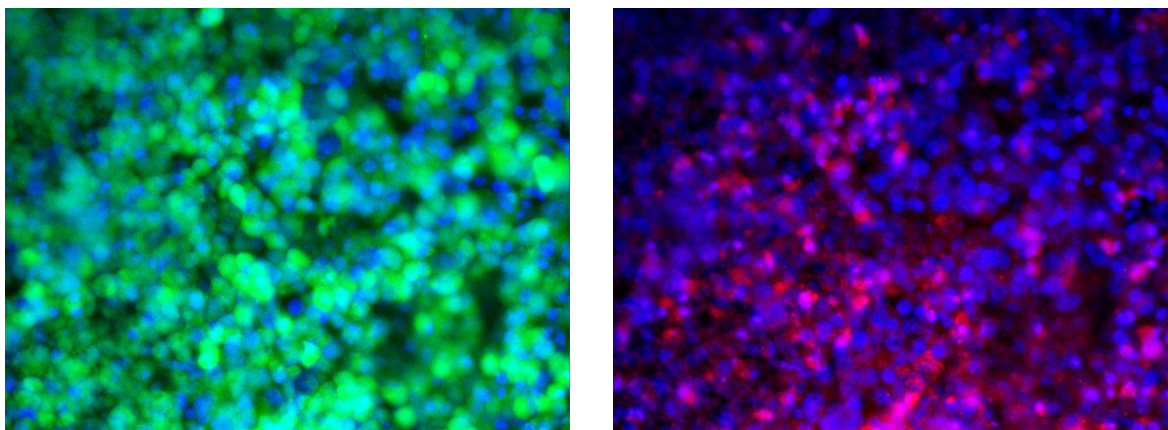


Рисунок 1 - Распределение размеров частиц в наноаэрозоля



а)

б)

Рисунок 2 – Микрофотографии монослоя клеток A549 через 96 часов после осаждения аэрозольной формы плазмиды. а) Анализ жизнеспособности. Зеленым (кальцеин) окрашена цитоплазма живых клеток. б) Анализ эффективности трансфекции. На фото красным отображается свечение красного флуоресцентного белка на мембранах трансфицированных клеток. Синим (бисбензими́д) окрашены ядра всех клеток

Выводы

Продемонстрирован значительный уровень эффективности трансфекции при доставке генетического вектора с добавлением трансфецирующего агента GenJect-40 на поверхность мембраны клеток A549 в виде аэрозольных частиц с размером 40-60 нм в модели «лёгкое-на-чипе». Эффективность трансфекции через 96 часов достигает 60% при сохранении жизнеспособности клеток более 90%.

Научное исследование проведено при поддержке Российского научного фонда (грант РНФ №23-25-00478).

Литература:

1. V.N. Morozov, I.L. Kanev, A.Y. Mikheev, E.A. Shlyapnikova, Y.M. Shlyapnikov, M.P. Nikitin, P.I. Nikitin, A.O. Nwabueze, M.L. van Hoek. Generation

and delivery of nanoaerosols from biological and biologically active substances. // J. Aerosol Sci. - 2014. – V.69. - pp. 48-61.

2. Морозов В. Н., Канев И. Л. Устройство контроля заряда биологически активных наноаэрозолей. Патент РФ № 2656762 от 25.08.2017.

ПРИМЕНЕНИЕ ХИТОЗАНОВОГО ПОРИСТОГО НОСИТЕЛЯ ДЛЯ ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

**Гапоян Л.М.^{1,2}, Жилякова Е.Т.² Веретенников Е.А.¹, Мошкова А.О.¹,
Воронов А.В.^{1,2}**

¹*Общество с ограниченной ответственностью «29 февраля», Санкт-Петербург, Россия*

²*Белгородский государственный национальный исследовательский университет (НИУ «БелГУ»), Белгород, Россия
e-mail: gapoyan-lev@yandex.ru*

APPLICATION OF CHITOSAN POROUS CARRIER FOR TRANSDERMAL DRUG DELIVERY

**Gapoyan L.M.^{1,2}, Zhilyakova E.T.² Veretennikov E.A.¹, Moshkova A.O.¹,
Voronov A.V.^{1,2}**

¹*Limited Liability Company "February 29", Saint Petersburg, Russia*

²*Belgorod State National Research University (NRU "BelSU"), Belgorod, Russia*

Отличительной особенностью хитозана - природного биополимера, является способность нарушать структуру межклеточных липидов рогового слоя, что позволяет проявлять проницаемость сквозь эпидермальный кожный барьер.

Благодаря этому трансдермальные изделия на основе хитозана открывают новые перспективы в медицине, позволяя контролируемо доставлять лекарственные препараты через кожу или другие биологические барьеры.

Трансдермальная доставка обеспечивает ряд преимуществ:

- Пролонгированное действие
- Снижение побочного воздействия
- Повышение биодоступности
- Уменьшения эффекта «первого прохождения» через печень и др.

Нами, на основе ранее полученного модифицированного хитозана (патент RU 2 720 627 C1), были разработаны биоматериалы на основе модифицированного хитозана в виде многопористых 3D губок, выполняющих роль носителя для биологически активных веществ. В них используется ранее описанное свойство проникать через барьер “заноса” молекулы действующего вещества, неспособные для преодоления барьера.

Кинетика высвобождения и прохождения активных веществ, на примере Миглустата, обладающего низкой биологической доступностью – порядка 15%, была проверена с использованием прибора типа «Лопастная мешалка», с применением мембраны «Карбосил», которая имитирует кожный человеческий покров.

Среда растворения – физиологический раствор (объем 500 мл), температура $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, скорость вращения лопасти мешалки – 50 об/мин. Определение проводили на 6 параллельных опытах.

Таблица 1 - Данные проницаемости

Точка отбора, час	Содержание миглустата в растворе, мг/мл	% высвобождения действующего вещества, %
0,5	0,072	36,0
2	0,108	54,2
4	0,146	73,6
24	0,176	89,1

Анализ данных показал, что хитозановый носитель в виде пористой губки позволяет использовать его в качестве трансверсального изделия для пролонгированного действия активных веществ. В зависимости от свойств действующих веществ и изменяя свойств используемого биоматериала могут быть достигнуты различные профили их высвобождения.

ВЛИЯНИЕ АГРЕГАЦИИ НАНОНОСИТЕЛЯ НА ТОКСИЧНЫЙ ЭФФЕКТ ПРИ ДОСТАВКЕ ДОКСОРУБИЦИНА

Грабовой А.С., Горбачева В.И., Колесова Е.П.

*АНОО ВО Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр
трансляционной медицины
e-mail: lexxx1595@gmail.com*

THE INFLUENCE OF NANOCARRIER AGGREGATION ON THE TOXIC EFFECT OF DOXORUBICIN DELIVERY

Grabovoy A.S., Gorbacheva V.I., Kolesova E.P.

Sirius University of Science and Technology

Альбуминовые наночастицы (АНЧ) представляют собой перспективные наноносители для доставки низкомолекулярных соединений в химиотерапии онкологических заболеваний [1]. Среди таких соединений можно выделить доксорубицин (DOX), который характеризуется высокой терапевтической эффективностью, но требует оптимальных условий доставки для минимизации нецелевых эффектов [2]. Одним из ключевых преимуществ АНЧ является высокая биосовместимость, возможность контролируемого высвобождения загруженных веществ, а также наличие на их поверхности функциональных групп, способствующих стабильному связыванию с низкомолекулярными соединениями [3]. Стандартный размер АНЧ составляет 100–120 нм, однако при загрузке наблюдается увеличение размера частиц, что может быть обусловлено их агрегацией [4]. Данный эффект может негативно сказываться на свойствах систем, изменяя их поведение в организме и снижая эффективность доставки препарата.

Цель работы заключалась в оценке влияния агрегации АНЧ, загруженных DOX, на цитотоксичность при увеличении концентрации загружаемого DOX. Для синтеза АНЧ использовался метод десольватации, а параметры полученных частиц оценивали с помощью метода динамического светорассеяния (DLS). Загрузка DOX в АНЧ проводилась путем совместной инкубации при постоянном

перемешивании. По завершении инкубации растворы центрифугировались, надосадочная жидкость отбиралась для дальнейшего оценивания эффективности инкапсуляции и эффективности загрузки DOX, которые определялись с помощью спектрофотометрических методов. Эффективность инкапсуляции рассчитывалась по формуле:

$$\left(1 - \frac{D_{\text{надосадочной жидкости}}}{D_{\text{контрольного раствора}}}\right) \cdot 100\%$$

где $D_{\text{надосадочной жидкости}}$ – оптическая плотность надосадочной жидкости;
 $D_{\text{контрольного раствора}}$ – оптическая плотность контрольного раствора.

Эффективность загрузки рассчитывалась по формуле:

$$\left(\frac{m_{\text{DOX}} \cdot \text{Эффективность инкапсуляции}}{m_{\text{АНЧ}} + m_{\text{DOX}} \cdot \text{Эффективность инкапсуляции}}\right) \cdot 100\%$$

где m_{DOX} – масса добавленного DOX; $m_{\text{АНЧ}}$ – масса наночастиц.

Цитотоксичность оценивалась на клеточных линиях SK-BR-3 с использованием МТТ-теста.

Было замечено, что при увеличении добавляемой концентрации лекарства к АНЧ увеличивается эффективность загрузки лекарства [5]. Поэтому для увеличения эффективности загрузки DOX в АНЧ проводились загрузки DOX концентрациями в интервале с 0.05 до 0.25 мг/мл к 1 мг АНЧ. Было обнаружено, что при увеличении концентрации раствора DOX при загрузке АНЧ эффективность загрузки выросла почти в два раза (таблица 1). При этом размер частиц вырос более чем в 10 раз по сравнению с изначальным при концентрации DOX 0.25 мг/мл и примерно в 1.5 раза при 0.05 мг/мл после 180 минут совместной инкубации (рисунок 1).

Таблица 1 - Влияние концентрации DOX на загрузку в АНЧ.

Масса АНЧ, мг	Добавляемая концентрация DOX, мг/мл	Эффективность инкапсуляции, %	Загруженная масса DOX, мг	Эффективность загрузки, %
1	0.05	61±6	0.03±0.0035	1.5±0.14
1	0.25	23±4	0.06±0.0075	2.8±0.46

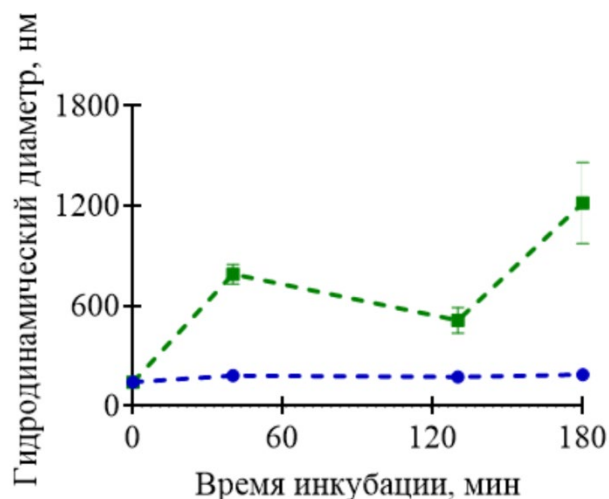


Рисунок 1 - Зависимость гидродинамического диаметра систем АНЧ-DOX от времени инкубации DOX с АНЧ, оцененная методом DLS.

Зеленая кривая – концентрация DOX 0.25 мг/мл. Синяя кривая – концентрация DOX 0.05 мг/мл

Увеличение размера частиц может быть обусловлено объединением отдельных частиц во все большие кластеры, что наблюдалось при образовании систем АНЧ-DOX с высокой (рисунок 1, зеленая кривая) и низкой (рисунок 1, синяя кривая) степенями агрегации. В литературе есть похожие примеры с увеличением размера получаемых систем на основе АНЧ с увеличением инкубируемой концентрацией загружаемого лекарственного средства [6].

Ожидается, что системы АНЧ-DOX с высокой степенью агрегации будут поглощаться клетками менее эффективно, чем системы с низкой степенью агрегации [7]. DOX оказывает цитотоксичность за счет интеркаляции в ДНК, а также за счет ингибирования топоизомеразы II, что суммарно негативно сказывается на способности клетки к делению [8]. Поэтому для определения влияния степени агрегации полученных систем АНЧ-DOX на терапевтический эффект загруженного DOX были проведены МТТ-тесты на клетках SK-BR-3. Были выбраны для оценки цитотоксичности такие временные точки как 48 и 96 часов. Данные точки выбраны по той причине, что при 48 часах произойдет как минимум одно деление у клеток из клеточной линии SK-BR-3, на которое DOX

имеет негативное влияние [9], а при 96 часах ожидается увидеть эффект пролонгированного высвобождения DOX из наночастиц по сравнению с эффектом свободного DOX [10].

Было обнаружено, что цитотоксичность систем АНЧ-DOX с высокой степенью агрегацией была ниже на 50% по сравнению с эквивалентным количеством свободного DOX (рисунок 2, А). При этом цитотоксичность систем с более низкой степенью агрегации была сравнима с цитотоксичностью свободного DOX (рисунок 2, Б), а при более длительном воздействии системы с низкой степенью агрегации показали сравнимую цитотоксичность с трехкратной дозой свободного DOX (рисунок 2, В).

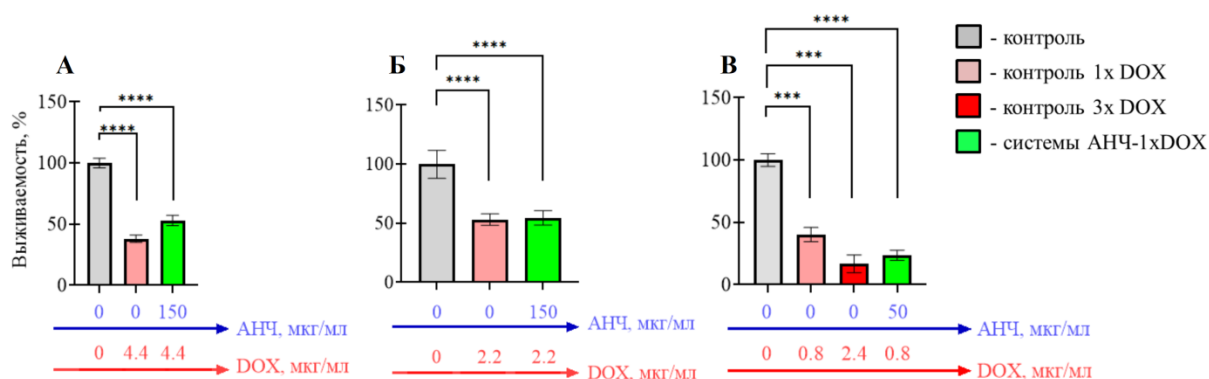


Рисунок 2 - Выживаемость SK-BR-3 после добавления систем АНЧ-DOX. (А) 48 часов инкубации с высоко агрегированными системами. (Б) 48 часов инкубации с низко агрегированными системами. (В) 96 часов инкубации с низко агрегированными системами

Таким образом, концентрация доксорубина в процессе загрузки АНЧ существенно влияет на степень агрегации, эффективность загрузки и, как следствие, на цитотоксическое действие получаемых систем. Оптимизация данного параметра является ключевым фактором для обеспечения эффективной и безопасной доставки лекарственных средств.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 24-24-20102.

Литература:

1. Srivastava A. Asian Biomedicine. 2020. Т. 14, Вып. 6. С. 1-23.
2. Mahani M. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2021. Т. 62. С. 102342.
3. Chen H. Theranostics. 2016. Т. 6. Вып. 2. С. 243-253.
4. von Storp B. J Microencapsul. 2012. Т. 29. Вып. 2. С. 138-146.
5. Green M.R. Ann Oncol. 2006. Т. 17. Вып. 8. С. 1263-1268.
6. Gao Y. PLoS ONE. 2021. Т. 16. Вып. 4. С. 1-25.
7. Behzadi S. Chem.Soc.Rev. 2017. Т. 46. Вып. 14. С. 4218-4244.
8. Kciuk M. Cells. 2023. Т. 12. Вып. 4. С. 659.
9. Duarte J.A. Pharmaceutics. 2023. Т. 15. Вып. 2. С. 369.
10. Katuwavila N.P. Journal of Nanomaterials. 2016. Т. 2016. С. 3178904.

**СОЗДАНИЕ ПОЛИКОМПЛЕКСНОГО НОСИТЕЛЯ НА ОСНОВЕ
ПРОИЗВОДНЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ ГАСТРОРЕТЕНТИВНОЙ
ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

Заболотная У.Н., Тимергалиева В.Р., Мустафин Р.И.

*ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет Минздрава
России, Институт фармации
e-mail: zabolotnaya.uliana@mail.ru*

**DEVELOPMENT OF A POLYCOMPLEX CARRIER BASED ON
CELLULOSE DERIVATIVE FOR GASTRORETENTIVE DRUG DELIVERY
SYSTEM**

Zabolotnaya U.N., Timergalieva V.R., Moustafine R.I.

Kazan State Medical University, Institute of Pharmacy

Актуальность. Носители на основе интерполимерного комплекса (ИПК) позволяют направлять активные фармацевтические ингредиенты (АФИ) непосредственно в оптимальный отдел желудочно-кишечного тракта, где

происходит их активное всасывание, что позволяет повысить эффективность фармакотерапии при различных заболеваниях [1].

Цель работы – создание поликомплексного носителя с участием Carborol® 71G (C71G) и гидроксипропилцеллюлозы (ГПЦ) с целью получения гастроретентивной системы для доставки ацикловира.

Материалы и методы. ИПК получали на основе полимеров фармацевтического назначения – ГПЦ и C71G. В качестве модельного АФИ использовали ацикловир. Синтез поликомплекса проводили в среде 95% этанола, предварительно подкисленного 0,05М HCl до значения pH, равного 3,5 ед.

Физико-химические свойства образцов ИПК, физической смеси (ФС) и индивидуальных полимеров (ИП) исследовали методами термического анализа: термогравиметрией – ТГА (Discovery TGA, TA Instruments, США) и модулированной дифференциально-сканирующей калориметрией – мДСК (Discovery DSC, TA Instruments, США), а также с помощью ИК-спектроскопии (iS5, Thermo Scientific, США).

Набухаемость оценивали путем термостатирования (IC control есо 18с, IKA® Werke GmbH, Германия) матриц образцов ИПК, ФС и ИП при температуре $37 \pm 0,5$ °С. В качестве среды использовали 0,1 М HCl, имитирующую среду голодного желудка. Эксперимент продолжался в течение 6 часов. Набухаемость оценивали, измеряя изменения массы таблетированных матриц каждые 30 мин.

Оценку высвобождения проводили в той же среде на тестере растворения DT 626 (Erweka, Германия) при $37 \pm 0,5$ °С по методу «вращающаяся корзинка» со скоростью вращения корзинки 100 об/мин.

Результаты. Синтезированный комплекс характеризовался термической стабильностью и единственной температурой стеклования.

На ИК-спектрах в области карбонильного поглощения у ИПК наблюдается сдвиг полосы поглощения до 1730 см^{-1} , что подтверждает образование поликомплекса, стабилизированного кооперативной системой водородных связей [2]. Матрица из ИПК показала устойчивость в кислой, имитирующей среду голодного желудка, среде.

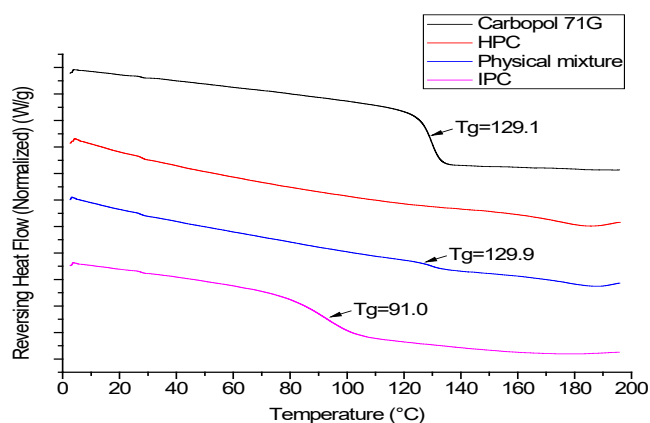


Рисунок 1 - мДСК-термограммы С71G, ГПЦ, их ФС и ИПК

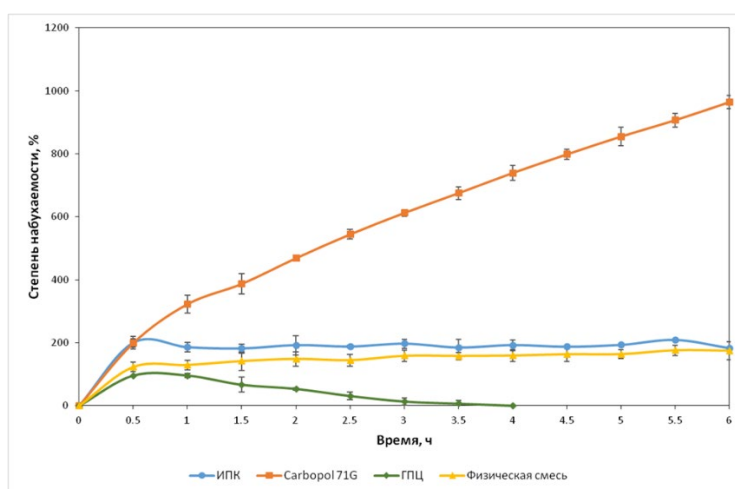


Рисунок 2 - Профиль набухания матриц исходных полимеров, их ФС и полученного ИПК в среде, имитирующей желудочный сок (0,1М HCl)

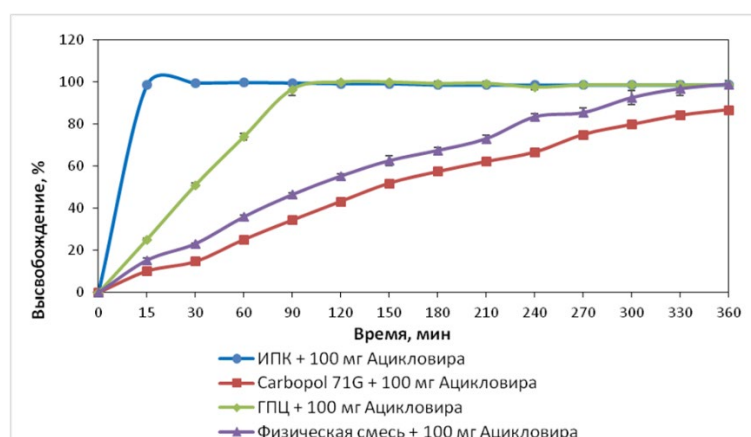


Рисунок 3 - Профиль высвобождения ацикловира из матриц индивидуальных полимеров, их ФС и полученного ИПК в среде, имитирующую желудочный сок (0,1М HCl)

Высвобождение ацикловира из поликомплексных матриц характеризуется стремительным выходом АФИ по истечении получаса.

Выводы. Исследуемый поликомплекс является перспективным для использования его в качестве носителя для гастроретентивной доставки ацикловира.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (научный проект № 23-15-00263).

Литература:

1. Khutoryanskiy V. V. et al. Morphological and thermal characterization of interpolymer complexes and blends based on poly (acrylic acid) and hydroxypropylcellulose //Polymer International. – 2004. – Т. 53. – №. 3. – С. 307-311.
2. Zhang X. et al. Hydrogen-bonded thin films of cellulose ethers and poly (acrylic acid) //Carbohydrate Polymers. – 2019. – Т. 215. – С. 58-62.

РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В ВИДЕ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ БИОДЕГРАДИРУЕМОЙ СИСТЕМЫ С ПОЛИМЕРНЫМИ МИКРОИГЛАМИ

Золотарева М.С.¹, Чуриков В.В.¹, Панов А.В.^{1,2}, Кедик С.А.^{1,2}

¹*ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет»,*

Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова,

кафедра биотехнологии и промышленной фармации

²*АО «Институт фармацевтических технологий»*

e-mail: mariya.zolotareva2014@yandex.ru

DESIGN OF BIODEGRADABLE POLYMERIC MICRONEEDLES FOR PROTEIN TRANSDERMAL DRUG DELIVERY

Zolotareva M.S.¹, Churikov V.V.¹, Panov A.V.^{1,2}, Kedik S.A.^{1,2}

¹ Federal State Budget Educational Institution of Higher Education

*"MIREA – Russian Technological University", Institute of fine chemical technologies
named after M.V. Lomonosov*

²JSC Institute of Pharmaceutical Technologies

Системы доставки на основе микроигл являются новым и актуальным подходом для доставки биологических препаратов, в частности, за счет безболезненности при введении, возможности стабилизации белковых молекул в составе полимерной матрицы растворяющихся микроигл, а также сопоставимости по фармакокинетике с подкожными инъекциями [1,2]. Данный подход может позволить снизить затраты на хранение и дистрибьюцию биопрепаратов, в том числе вакцин, а также сделать введение подобных биопрепаратов более привлекательным для пациента [3].

В связи с этим целью данной работы было разработать состав и технологию получения биопрепаратов в виде медицинской терапевтической биодеградируемой системы с полимерными микроиглами.

Мастер-формы для изготовления микроигл получали из полиэтилентерефталата методом лазерной микрообработки. Микроиглы получали методом отлива из водного раствора на матричную форму при подаче вакуума снизу. В качестве материала для изготовления микроигл использовался пуллулан и поливиниловый спирт и их комбинации. При разработке состава микроигл проводили оценку их геометрии и физико-механических свойств. При разработке технологии изготовления микроигл, содержащих модельный белок, дополнительно оценивали стабильность препарата непосредственно после изготовления и при хранении.

В ходе работы был подобран состав полимерных растворяющихся микроигл из смеси пуллулана и поливинилового спирта, который позволяет

получить микроиглы, обладающие необходимой механической прочностью (не менее 0,032 Н/МИ) и временем растворения (не более 2-х минут *in vitro*), и обеспечивает глубину проникновения растворяющихся микроигл достаточную для доставки биопрепарата в слой дермы (рис. 1).

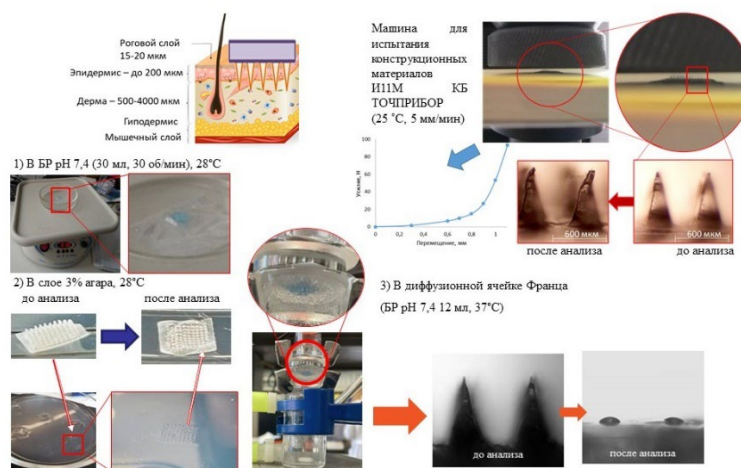


Рисунок 1 - Оценка качества растворяющихся микроигл

Была изучена и экспериментально реализована технология изготовления биопрепаратов в виде системы доставки на основе растворяющихся микроигл с использованием человеческого сывороточного альбумина в качестве модельного препарата, которая позволяет получать воспроизводимые массивы микроигл заданной геометрии, сохраняя структуру белков внутри полимерной матрицы в производственном процессе (рис. 2). Согласно экспериментам по изучению стабильности модельного препарата доказана возможность его хранения в виде терапевтической системы с полимерными микроиглами вне условий холодовой цепи ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) в течение не менее двух лет, что доказывает перспективы использования данной разработки в фармацевтической отрасли.

Разработанный состав и технология являются перспективными для создания биопрепаратов в виде медицинской терапевтической биodeградируемой системы с полимерными микроиглами.

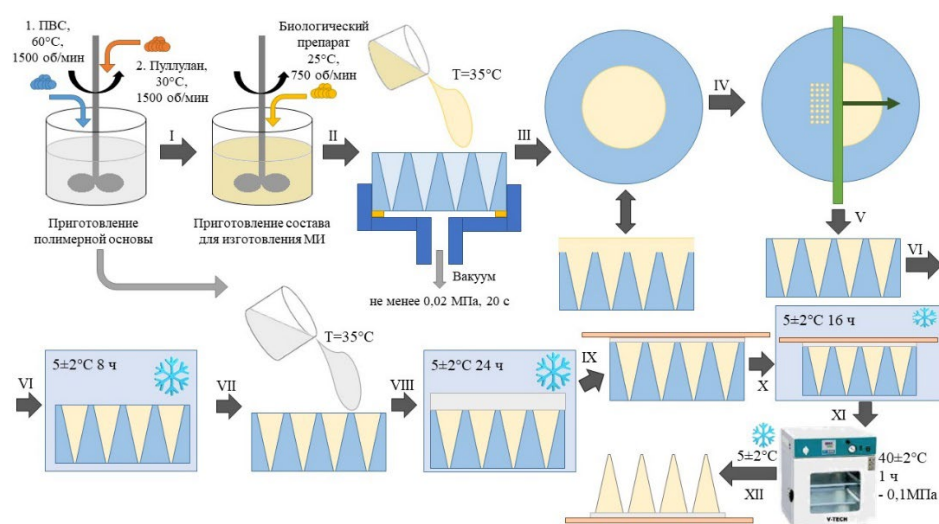


Рисунок 2 - Визуализация процесса изготовления растворяющихся микроигл

Литература:

1. Jung J.H., Jin S.G. J. Pharm. Investig. 2021. V. 51. P. 503–517.
2. Hulimane Shivaswamy R, Binulal P, Benoy A, Lakshmiramanan K, Bhaskar N, Pandya HJ. ACS Mater Au. 2024. V. 5, I. 1. P. 115-140.
3. Phoka T., Thanuthanakhun N., et all. Vaccine X. 2023. V. 16, I. 15. 100398.

КОМБИНИРОВАННАЯ ПОЛИМЕРНАЯ НАНОРАЗМЕРНАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ АМФИФИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИ-N- ВИНИЛПИРРОЛИДОНА С ПОВЫШЕННОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬЮ ПРОТИВ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Куковьякина Е.В.¹, Гаспарян М.Э.², Яголович А.В.³, Кусков А.Н.¹

¹Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева,
кафедра технологии химико-фармацевтических и косметических средств

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

Овчинникова РАН, Лаборатория инженерии белка

³Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, кафедра
биоинженерии

e-mail: kukoviakina.e.v@muctr.ru

**COMBINED POLYMERIC NANO-SIZED SYSTEM BASED ON
AMPHIPHILIC DERIVATIVES OF POLY-N-VINYLPYRROLIDONE WITH
ENHANCED CYTOTOXICITY AGAINST PANCREATIC CANCER CELLS**

Kukovyakina E.V.¹, Gasparian M.E.², Yagolovich A.V.³, Kuskov A.N.¹

¹Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia

*²Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of The Russian
Academy of Sciences*

³Lomonosov Moscow State University

Препараты на основе противоопухолевого цитокина TRAIL часто применяют для иммобилизации на поверхности наночастиц, поскольку его рецепторы, в первую очередь DR5, гиперэкспрессированы в опухолевых клетках, и индуцируют клеточную гибель путем апоптоза при связывании с лигандом. В работе исследованы наночастицы на основе амфифильных производных поли-N-винилпирролидона с инкапсулированным бортезомибом, конъюгированные с DR5-селективным вариантом цитокина TRAIL DR5-B в роли таргетного лиганда для направленной доставки в опухоль.

Наночастицы с бортезомибом были получены эмульсионным методом с последующей отгонкой растворителя под вакуумом. DR5-B получали в виде рекомбинантного белка путем экспрессии в штамме *E. coli* SHuffle B с последующей очисткой металл-аффинной и ионообменной хроматографией и конъюгацией с наночастицами в физиологическом растворе. Клеточную жизнеспособность определяли методом MTT. Механизм гибели клеток изучали с помощью пан-каспазного ингибитора Z-Vad(OMe)-FMK.

Сорбционная емкость комбинированных наноразмерных частиц составила 5.0 ± 0.5 мкг DR5-B на 1 г частиц. Наблюдалось существенное снижение жизнеспособности клеточных линий аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1 и MIA PaCa-2 под действием комбинированных наноразмерных частиц в сравнении как со свободным лигандом DR5-B, так и с не конъюгированными наночастицами, загруженными бортезомибом. Гибель клеток под действием

комбинированных наноразмерных частиц преимущественно происходила по механизму апоптоза. Важно отметить, что на здоровых клетках не наблюдалось выраженной цитотоксичности.

Повышенная цитотоксичность наноразмерных частиц обусловлена комбинированным воздействием препаратов различной природы. Лиганд DR5-B не только способен самостоятельно уничтожать опухолевые клетки, но также проявляет синергетический противоопухолевый эффект в комбинации с бортезомибом. Кроме того, DR5-B обуславливает улучшенную кластеризацию рецептора DR5 при иммобилизации на поверхности наночастиц, а также может выступать как таргетный агент для нацеливания на опухолевые клетки. Таким образом, разработанная комбинированная наносистема перспективна для дальнейших исследований *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта

РНФ №23-15-00468.

КОНЬЮГАТЫ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ С АЗАКРАУН- ЭФИРАМИ В КАЧЕСТВЕ ПЕРСПЕКТИВНОЙ НАНОПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В РАДИОФАРМАЦЕВТИКЕ

Меньшиков-Тонян М.А.¹, Хабирова С.Ю.², Алешин Г.Ю.², Щукина А.А.¹,

Зубенко А.Д.¹, Федоров Ю.В.¹

¹ *Институт элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова*

Российской академии наук,

² *Химический факультет Московского государственного университета имени*

М.В. Ломоносова

e-mail: tamt@ineos.ac.ru

**CONJUGATES OF CERIUM DIOXIDE NANOPARTICLES WITH
AZACROWN ETHERS AS A PROMISING NANOPLATFORM FOR
APPLICATION IN RADIOPHARMACEUTICS**

Menshikov-Tonyan M.A.¹, Khabirova S.Yu.², Aleshin G.Yu.², Shchukina A.A.¹,

Zubenko A.D.¹, Fedorov Yu.V.¹

*¹A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds Russian Academy of
Sciences*

²M.V. Lomonosov Moscow State University

Наночастицы демонстрируют повышенное накопление в опухолевых тканях, и это свойство может быть использовано в таргетной терапии, особенно в ядерной медицине. Наночастицы диоксида церия характеризуются низкой токсичностью, высокой биосовместимостью, эффективным выведением из организма и значительным накоплением в органах-мишенях. Эти свойства помогают снизить системную дозовую нагрузку, что делает наночастицы диоксида церия перспективными кандидатами для противораковых исследований. Диоксид церия обладает двойной функциональностью: он может повышать жизнеспособность здоровых клеток, смягчая окислительный стресс благодаря своим антиоксидантным свойствам, и одновременно оказывать цитотоксическое воздействие на опухолевые клетки.

Целью данной работы был синтез конъюгатов диоксида церия с бифункциональными хелаторами для связывания радиоактивных металлов. В работе использовался ранее новый комплексон **L**, ранее разработанный в нашей лаборатории, а также «золотой стандарт» для ядерной медицины – хелатор **DOTA**. Полученные конъюгаты (Рис.1) были охарактеризованы с использованием просвечивающей электронной микроскопии, инфракрасной спектроскопии, рамановской спектроскопии, термогравиметрического анализа и измерений сдвига изоэлектрической точки. Радиоактивное мечение было изучено при помощи гамма-спектрометрии.

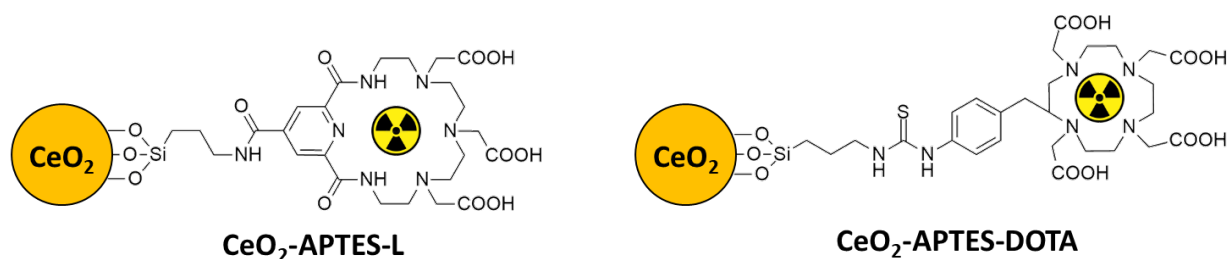


Рисунок 1 - Структуры конъюгатов, используемых в данной работе

Были исследованы оптимальные условия мечения для комплексов с $[^{65}\text{Zn}]\text{Zn}^{2+}$ и $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$ и проведена оценка их стабильности в биологически значимых средах [1]. Результаты показали, что комплекс **CeO₂-APTES-L- $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$** продемонстрировал стабильность в этих условиях в течение более 8 часов. Кроме того, наночастицы CeO₂ и его производные не проявили значительной токсичности по отношению к эндотелиальным клеткам человека EA.hy926. Была подтверждена стабильность комплекса **CeO₂-APTES-L- $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$** по данным *in vivo* экспериментов на мышах C57Bl/6. Данные результаты свидетельствуют о том, что наночастицы диоксида церия обладают потенциалом в качестве наноносителей для адресной доставки лекарств, особенно в области ядерной медицины.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №23-13-00424.

Литература:

1. S.Yu. Khabirova, M.A. Menshikov-Tonyan *et al*, *RSC Med. Chem.* **2024**, 15, 4100-4110.

**АПРОБАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЕЗИКУЛ ДЛЯ ДОСТАВКИ
ШАПЕРОНА HSP70 - АКТИВАТОРА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО
ИММУННОГО ОТВЕТА**

Штам Т.А.^{1,2}, Гараева Л.А.¹, Комарова Е.Ю.², Емельянова С.С.¹,

Коневега А.Л.¹, Маргулис Б.А.², Гужова И.В.²

¹ *«Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
Отделение молекулярной и радиационной биофизики*

² *Институт цитологии РАН, Лаборатория защитных механизмов клетки,
e-mail: shtam_ta@pnpi.nrcki.ru*

**TESTING PLANT-BASED VESICLES FOR DELIVERY OF HSP70
CHAPERONE - AN ACTIVATOR OF ANTITUMOR IMMUNE RESPONSE**

**Shtam T.A.^{1,2}, Garaeva L.A.¹, Komarova E.Yu.², Emelianova S.S.¹, Konevega A.L.¹,
Margulis B.A.², Guzhova I.V.²**

¹ *St.Petersburg Nuclear Physics Institute Named by B.P. Konstantinov of National
Research Centre «Kurchatov Institute»*

² *Institute of Cytology of Russian Academy of Sciences*

Растительные везикулы - наноразмерные частицы, которые все чаще рассматриваются в качестве доставщиков терапевтических биомолекул, в том числе и для лечения опухолевых заболеваний [1,2]. Одним из перспективных методов терапии злокачественных новообразований является активация противоопухолевого иммунитета на основе шаперона HSP70, который при доставке в опухолевые клетки способен спровоцировать активацию врожденного и адаптивного иммунного ответа [3,4]. На сегодняшний день разработан ряд противоопухолевых вакцин на основе HSP70, которые не были одобрены для клинической практики, несмотря на эффективные показатели в ходе лабораторных исследований, что свидетельствует об актуальности разработки новых и усовершенствования существующих препаратов на основе HSP70. Повысить эффективность иммунотерапевтического подхода на основе

рекомбинантного HSP70 возможно за счет повышения его биодоступности для опухолевых клеток, например, при помощи его инкапсулирования в наночастицы различной природы, в том числе в экстраклеточные везикулы растительного происхождения.

Цель работы – апробация растительных везикул, выделенных из плодов грейпфрута, для доставки экзогенного функционально активного HSP70 к опухолевым клеткам *in vitro* и *in vivo* с целью активации противоопухолевого иммунного ответа.

Апробацию потенциала экстраклеточных везикул грейпфрута (GEVs) для доставки терапевтического белка проводили на двух моделях опухолей, СТ-26 (аденокарцинома кишечника мыши) и В16 (меланома мыши). В экспериментах *in vitro* было показано, что экзогенный HSP70 в свободной форме и в составе GEVs увеличивает чувствительность клеток СТ-26 и В16 к цитотоксическим лимфоцитам и натуральным киллерам. Для проверки активации противоопухолевого ответа *in vivo* использовали два способа воздействия рекомбинантного HSP70 в составе GEVs на прогрессию опухолей. Так для формирования опухолевого узла, клетки СТ-26 прививали подкожно мышам BALB/с совместно с GEVs, предварительно нагруженными белком HSP70 (GEV-HSP70). Для формирования модели меланомы клетки В16 были привиты подкожно мышам BALB/с и спустя 5 дней после инъекции опухолевое новообразование наружно обрабатывали гидрогелем с нагруженными белком HSP70 GEVs каждые 3 дня. Для целевой группы мышей с привитыми клетками СТ-26 было показано увеличение продолжительности жизни животных и уменьшение размера опухоли в 3 раза, а также снижение уровня факторов TGFB1, IL-10 в плазме крови по сравнению с группами контроля (Рисунок 1).

Для модели меланомы В16 было показано уменьшения массы опухолевого новообразования в 20 раз и значительное увеличение продолжительности жизни для данной группы животных относительно групп сравнения. Как для опухолей СТ-26, так и В16 было продемонстрировано вовлеченность CD8⁺T-лимфоцитов в наблюдаемые на животных моделях противоопухолевые эффекты.

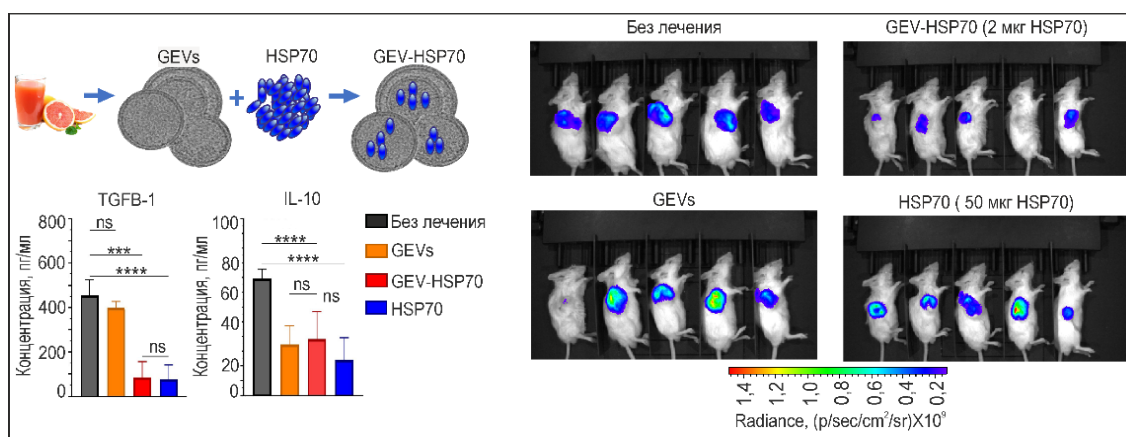


Рисунок 1 - Оценка активации противоопухолевого иммунитета при помощи GEV-HSP70 на мышиной модели карциномы толстой кишки. На правой панели представлена прижизненная визуализация опухолевых узлов; на левой панели - изменение цитокинового профиля в плазме крови экспериментальных животных

На основе полученных данных, можно заключить, что растительные везикулы, нагруженные HSP70, способствуют активации противоопухолевого иммунитета *in vitro* и *in vivo*.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 19-74-20146-n).

Литература

1. Akuma, P.; Okagu, O.D.; Udenigwe, C.C. Naturally Occurring Exosome Vesicles as Potential Delivery Vehicle for Bioactive Compounds. *Front. Sustain. Food Syst.* **2019**, *3*, doi:10.3389/fsufs.2019.00023.
2. Garaeva, L.; Kamyshinsky, R.; Kil, Y.; Varfolomeeva, E.; Verlov, N.; Komarova, E.; Garmay, Y.; Landa, S.; Burdakov, V.; Myasnikov, A.; и др. Delivery of functional exogenous proteins by plant-derived vesicles to human cells in vitro. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 6489, doi:10.1038/s41598-021-85833-y.
3. Hu, B.; Liu, G.; Zhao, K.; Zhang, G. Diversity of extracellular HSP70 in cancer: advancing from a molecular biomarker to a novel therapeutic target. *Front. Oncol.* **2024**, *14*, doi:10.3389/fonc.2024.1388999.

4. Komarova, E.Y.; Suezov, R. V.; Nikotina, A.D.; Aksenov, N.D.; Garaeva, L.A.; Shtam, T.A.; Zhakhov, A. V.; Martynova, M.G.; Bystrova, O.A.; Istomina, M.S.; и др. Hsp70-containing extracellular vesicles are capable of activating of adaptive immunity in models of mouse melanoma and colon carcinoma. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 21314, doi:10.1038/s41598-021-00734-4.

ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ И СТАНДАРТИЗАЦИИ ПЛЕНКООБРАЗУЮЩИХ АЭРОДИСПЕРСНЫХ СИСТЕМ

Шумкова М.М.¹, Пуя Г.¹, Помыткина М.В.³, Бахрушина Е.О.^{1,2}

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Институт фармации им. А.П. Нелюбина, Научно-образовательный исследовательский центр «ФАРМА-ПРЕМИУМ»,

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Институт фармации им. А.П. Нелюбина, кафедра фармацевтической технологии

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Институт цифрового биодизайна и моделирования живых систем, кафедра биологической химии

e-mail: shumkovamm@gmail.com

APPROACHES TO THE DEVELOPMENT AND STANDARDIZATION OF SPRAY FILM-FORMING SYSTEMS

Shumkova M.M., Pouya G., Pomytkina M.V., Bakhrushina E.O.

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)

Цель и задачи исследования

Целью исследования являлось создание подхода к фармацевтической разработке (ФР) и стандартизации пленкообразующих аэродисперсных систем (ПАС) с учётом комплексного взаимодействия компонентов и условий формирования системы, отвечающие принципам подхода «качества путем

разработки» (Quality-by-Design, QbD). Задачами исследования являлось изучение свойств ПАС, разработка методик их определения, а также технологии для получения системы с заданными характеристиками с последующим представлением последовательности этапов ФР в виде алгоритма.

Материалы и методы

Проведены анализ научных и патентных источников, экспериментальный подбор вспомогательных веществ, исследование физико-химических и биофармацевтических свойств пленок на примере разработки формы с антимикробными компонентами. Апробированы лабораторные технологии наполнения аэрозолей и их оценки. Использовались валидированные методики оценки пленкообразования [1], биоадгезии [2], прочности на разрыв [3,4], окклюзии [5], высвобождения, реологии и других параметров. Дополнительно проводились измерения pH [2,3,4,7] и плотности растворов [4,7] с использованием лабораторного pH-метра ST2100-E (Ohaus, Германия), пипетки (Joanlab, China), весов аналитических (MettlerToledo, США). Для исследования реологических свойств использовался ротационный вискозиметр (Lamy, France) [2,4,6,8]. Параметры пленкообразования оценивались путем измерения времени высыхания на модели, имитирующей кожу, полученной из С-силикона (Zhermack, Польша-Италия) [2,4], прочности на разрыв и эластичности [3,4,8]. Морфология и равномерность покрытия исследовались визуально и с использованием микроскопии. Разработанные композиции также исследовались в аэрозольной форме — с определением параметров распыления (площадь, угол) [2,7,8,9] и по фармакопейным параметрам в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Российской Федерации XV издания [4,7]. Подбор клапанов и распылительных головок проводился на основе анализа физических свойств составов [10].

Результаты

На основании научных и нормативных документов, а также экспериментальных данных был разработан алгоритм фармацевтической разработки пленкообразующих аэрозолей и спреев в соответствии с подходом

QbD: выбор системы, разработка концентрата (подбор активной фармацевтической субстанции (АФС), вспомогательных веществ (ВВ), оценка свойств композиции), выбор пропеллента (обоснован выбор сжиженных газов для поддержания давления системы), теоретическая и практическая оценка (с использованием колбы визуального контроля), разработка технологии готовой лекарственной формы (ГЛФ) (смешивание или диспергирование, фильтрация концентрата и пропеллента (с предварительной оценкой размера частиц и сорбции на мембране), вакуумирование, вальцевание, наполнение баллона пропеллентом), скрининг клапанов и актуаторов, исследование агрегативной устойчивости и химической совместимости отдельных фаз, проведение стресс-тестов. При выборе клапана учитываются: тип штока, тип прокладки, факел распыления, паттерн образуемой пленки, дисперсность частиц, наличие отверстия для газовой фазы, тип распыления, совместимость материалов с концентратом (в том числе устойчивость к коррозии, влияние на герметичность упаковки и др.), форма распыления [11]. При выборе контейнера или баллона учитывают не только материал корпуса, но и состав покрывающего его изнутри лака [10]. При выборе актуатора учитывают материал, строение, дисперсность получаемых частиц. Также возможно использование шарика различных размеров, изготовленных из инертных материалов. Возможно исследование экстрагируемых веществ из упаковки. Следует отметить, что на этапе скрининга клапанов и актуаторов определяются отдельные свойства распыления исходя из видов структурных элементов клапанов и строения актуатора, а затем производится заказ у производителя элементов первичной упаковки, химически совместимыми с концентратом и пропеллентом, чтобы обеспечить не только стабильность, но и герметичность системы.

Выводы

На основании проведенного исследования предложен алгоритм разработки пленкообразующих аэродисперсных систем на основе принципов QbD. Оценка свойств ПАС проводится по биофармацевтическим, физико-химическим, вязко-пластическим и иным параметрам качества, чтобы обеспечить рентабельность

производства безопасного и эффективного лекарственного средства, отвечающего потребностям потребителя. Учтены особенности лабораторной наработки как спреев, так и аэрозолей. Установлена важность предварительного скрининга компонентов и элементов первичной упаковки для обеспечения необходимых биофармацевтических свойств. Представленный подход позволяет повысить воспроизводимость, безопасность и качество инновационных лекарственных форм.

Литература:

1. Edwards A., Qi S., Liu F., Brown M.B., McAuley W.J. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2017. T.114. C.164–174.
2. Gohel M.C., Nagori S.A. AAPS PharmSciTech. 2009. T.10. C.684–691.
3. Pünnel L.C., Lunter D.J. Pharmaceutics. 2021. T.13(7).
4. Sritharadol R., Nakpheng T., Wan Sia Heng P., Srichana T. Drug Dev. Ind. Pharm. 2017. T.43(10). C.1715–1728.
5. Reish R.G. et al. Wound Repair Regen. 2009. T.17(6). C.806–816.
6. Schroeder I.Z. et al. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2007. T.65(1). C.111–121.
7. Bakkiyaraj D., Sritharadol R., Padmavathi A.R., Nakpheng T., Srichana T. Biofouling. 2017. T.33(7). C.591–600.
8. Ranade S., Bajaj A., Londhe V., Babul N., Kao D. Eur. J. Pharm. Sci. 2017. T.100. C.132–141.
9. Bakshi A. et al. Indian J. Pharm. Sci. 2008. T.70(6). C.733.
10. Niemiec K., Fitrzyk A., Grabowik C. IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 2018. T.400. Ст.022040.
11. Кореньков Г.Л., Кузьменко И.Е., Лейнасапе Д.А., Мерсова Н.А. 1968.

**УДАЛЕНИЕ КОНЦЕВЫХ СИАЛОВЫХ КИСЛОТ ПРИВОДИТ К
ПОВЫШЕНИЮ УРОВНЯ АКТИВАЦИИ ИММУННЫХ КЛЕТОК**

**Березкина М.Э.^{1,2}, Пенькова Е.В.¹, Чернышова Д.О.¹, Нисканен С.А.¹,
Виноходов Д.О.²**

¹АО «Биокад», Департамент ранней разработки белковых препаратов 2.0

²Санкт-Петербургский государственный технологический институт
(технический университет), кафедра молекулярной биотехнологии
e-mail: berezkiname@biocad.ru

**REMOVAL OF TERMINAL SIALIC ACIDS INCREASES IMMUNE CELL
ACTIVATION**

**Berezkina M.E.^{1,2}, Penkova E.V.¹, Chernyshova D.O.¹, Niskanen S.A.¹,
Vinokhodov D.O.²**

¹JSC “Biocad”

²Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University)

Цель данной работы – изучение роли сialовых кислот в ингибировании Т-лимфоцитов при их взаимодействии с антигенпрезентирующими клетками.

Сialовые кислоты – концевые углеводы гликановых структур на поверхности клеток млекопитающих [1]. Благодаря своему терминальному положению и физико-химическим свойствам, сialовые кислоты могут влиять на многие иммунные процессы [2]. Существуют данные, подтверждающие роль сialовых кислот в прогрессировании злокачественных новообразований [3]. Изучение вклада сialовых кислот в ингибирование активации иммунных клеток является актуальной задачей, поскольку позволит создать новые подходы противоопухолевой терапии.

Методы работы включают выделение моноцитов периферической крови человека и их дифференцировку в дендритные клетки (ДК), магнитную сепарацию Т-лимфоцитов, удаление концевых сialовых кислот с поверхности

клеток с помощью фермента $\alpha 2-3,6,8$ нейраминидазы, совместное культивирование ДК и Т-лимфоцитов, оценку выброса цитокинов методом иммуноферментного анализа, а также оценку уровня активации Т-лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии. Статистическая обработка данных проведена с помощью теста Даннета, $n=3$: $*p<0,05$, $**<0,01$, $***<0,001$, $****<0,0001$. На графиках представлены данные увеличения уровня активации относительно необработанных клеток.

Показано, что десиалирование Т-лимфоцитов, а также одновременное десиалирование Т-лимфоцитов и ДК приводит к повышению выброса цитокинов IL-2 на 62-76%, IFN γ на 51-68% и MCP-1 на 69-96% при их совместном инкубировании. Содержание цитокина IL-8 не зависит от предварительного десиалирования ни ДК, ни Т-лимфоцитов. Кроме того, десиалирование ДК не приводит к увеличению выброса ни одного из проанализированных цитокинов (Рис. 1).

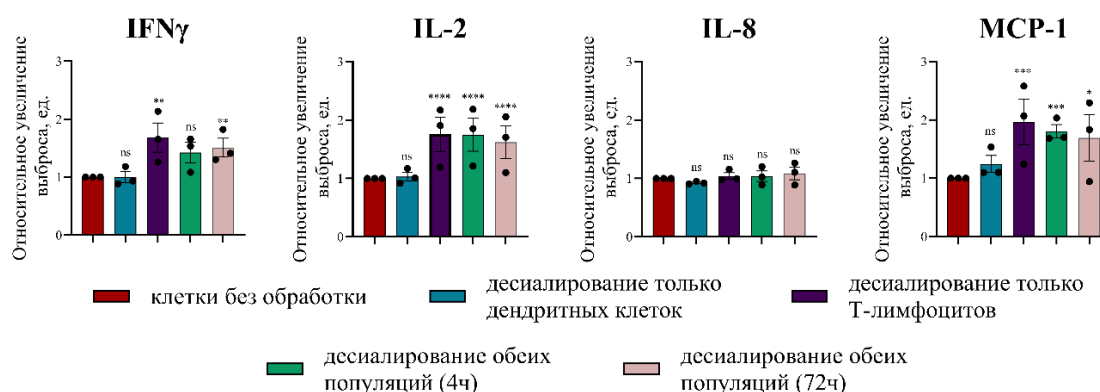


Рисунок 1 - Изменение выброса цитокинов после десиалирования ДК и Т-лимфоцитов

При совместном десиалировании Т-лимфоцитов и ДК увеличивается представленность маркеров активации на CD4 и CD8-положительных популяциях: CD107a – на 4-25%, CD69 – на 20-46% и CD25 – на 9-20%. При десиалировании только Т-клеток показано увеличение представленности маркера CD107a (на CD4 и CD8-положительных популяциях), при десиалировании только ДК – увеличение маркера CD69 (на CD4-положительной

популяции) (Рис. 2).

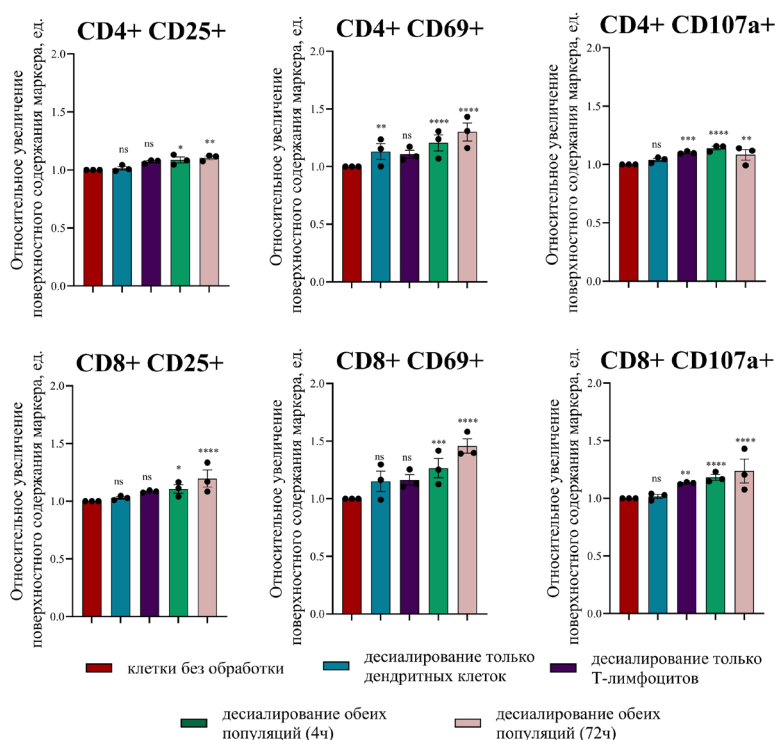


Рисунок 2 - Изменение уровня активации Т-лимфоцитов после десиалирования ДК и Т-лимфоцитов

На основе полученных результатов сделаны следующие **выводы**:

1. Сиаловые кислоты на поверхности Т-лимфоцитов влияют на ингибирование выброса цитокинов IL-2, IFN γ и MCP-1 при их совместном инкубировании с ДК.

2. Сиаловые кислоты на поверхности Т-лимфоцитов влияют на представленность маркеров активации Т-лимфоцитов CD25, CD69, CD107a, а на поверхности ДК на представленность маркера активации Т-лимфоцитов CD69 при их совместном инкубировании.

Таким образом показано, что удаление концевых сиаловых кислот с поверхности клеток опосредует увеличение уровня активации Т-лимфоцитов в процессе презентации антигена.

Сиаловые кислоты играют роль в подавлении активности иммунных клеток при презентации антигена. Эти результаты могут служить основой для

дальнейшего изучения влияния сialовых кислот на межклеточные взаимодействия между антигенпрезентирующими клетками и Т-лимфоцитами, а также для разработки новых подходов в иммунотерапии.

Литература:

1. Zhou X. et al. Sialylation: A Cloak for Tumors to Trick the Immune System in the Microenvironment // *Biology (Basel)*. MDPI, 2023. Vol. 12, № 6. P. 832.
2. Crespo H.J., Lau J.T.Y., Videira P.A. Dendritic Cells: A Spot on Sialic Acid // *Front. Immunol.* 2013. Vol. 4, № DEC. P. 491.
3. Zhou X., Yang G., Guan F. Biological Functions and Analytical Strategies of Sialic Acids in Tumor // *Cells. NLM (Medline)*, 2020. Vol. 9, № 2. P. 273.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ FC-СЛИТНЫХ БЕЛКОВ С СЕЛЕКЦИОННЫМИ МАРКЕРАМИ DHFR И GS НА ОСНОВЕ АПОПТОЗ-РЕЗИСТЕНТНОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК CHO 4BGD

**Воробьев И.И., Орлова Н.А., Синегубова М.В., Шайфутдинов Р.Р.,
Колесов Д.Э.**

Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина ФИЦ Биотехнологии РАН

e-mail: ptichman@gmail.com

GENERATION OF FC-FUSION PROTEIN PRODUCERS WITH DHFR AND GS SELECTION MARKERS BASED ON THE APOPTOSIS-RESISTANT CHO 4BGD CELL LINE

Vorobyov I.I., Orlova N.A., Sinegubova M.V., Shaifutdinov R.R., Kolesov D.E.

Center of Bioengineering, Research Center of Biotechnology RAS

Цель: Разработать платформенный способ получения продуцентов Fc-слитных белков в клетках апоптоз-резистентных клетках CHO.

Актуальность: Клетки CHO с множественными направленными изменениями генома в настоящее время становятся необходимым инструментом

для получения промышленных линий-продуцентов, способных к длительной культивации с высокой клеточной плотностью. Поведение таких клеток при селекции продуцентов, геномной амплификации трансгенов и отборе клональных продуцентов существенно отличается от поведения интактных клеток CHO.

Методы: При помощи векторных плазмид с промотором EEF1A1, фрагментом длинного концевого повтора вируса Эпштейна-Барр и селекционными маркерами DHFR и GS были получены продуценты четырех клинически значимых Fc-слитных белков в ранее созданных нами апоптоз-резистентных клетках CHO 4BGD. Для двух Fc-слитных белков были получены панели клональных продуцентов и проведено культивирование с подпиткой (fed batch) для отобранных клонов. Один из клональных продуцентов был детально охарактеризован полногеномным секвенированием с использованием очень длинных прочтений Nanopore.

Результаты: Было установлено, что апоптоз-резистентные клетки CHO 4BGD, в отличие от интактных клеток CHO DG-44 и аналогичных, перестают поддерживать амплификацию трансгенов при ослаблении селекционного маркера. Использование пары плазмид с селекционными маркерами DHFR и GS вместо одной плазмиды с маркером DHFR позволяет увеличить время культивирования продуцентов в режиме fed batch. Продуктивное время культивирования для таких продуцентов достигает 18 дней без падения жизнеспособности ниже 80%, титр целевого белка не менее 1 г/л. Анализ генома клонального продуцента, полученного при помощи пары плазмид, показал, что инсерция плазмид с селекционным маркером DHFR произошла в две точки на хромосоме 5 с последующей амплификацией всей ДНК из областей инсерции, общее число копий целевого гена в клетке – более 200, а инсерция плазмиды с маркером устойчивости GS – в хромосому 8, в форме простого конкатемера, общее число копий на клетку – 7. Несмотря на использование геномной амплификации, в области открытой рамки считывания целевого гена мутации статистически достоверно не выявлялись.

Выводы: Апоптоз-резистентные клетки CHO 4BGD пригодны для получения продуцентов Fc-слитных белков с применением геномной амплификации и последовательным введением плазмид с двумя метаболическими селекционными маркерами. Получаемые клональные продуценты сохраняют способность к очень длительному культивированию с подпиткой без падения жизнеспособности.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект 125052006274-4).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОЧЕК ИНСЕРЦИИ ЦЕЛЕВЫХ ПЛАЗМИД В ГЕНОМ И АНАЛИЗ СОБЫТИЙ ГЕНОМНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ЛИНИИ- ПРОДУЦЕНТА НА ОСНОВЕ КЛЕТОК CHO ПРИ ПОМОЩИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ OXFORD NANOPORE

Колесов Д.Э., Синегубова М.В., Воробьев И.И., Орлова Н.А.

Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина ФИЦ Биотехнологии РАН

e-mail: 52ru111@mail.ru

MAPPING TARGET PLASMID INTEGRATION SITES AND ANALYSIS OF GENOMIC AMPLIFICATION EVENTS IN A CHO-BASED PRODUCER CELL LINE USING OXFORD NANOPORE SEQUENCING

Kolesov D.E., Sinegubova M.V., Vorobyov I.I., and Orlova N.A.

Center of Bioengineering, Research Center of Biotechnology RAS

Цель: определить точки инсерции экспрессионных плазмид в геном клеточной линии, а также ориентацию и копияность вставки, фланкирующие участки и изменения в области амплификации.

Актуальность: В настоящий момент клетки CHO являются наиболее популярной платформой для производства биофармацевтических препаратов. Сайт интеграции целевой плазмиды может оказывать значительное влияние на

продуктивность клеточной линии. Помимо этого, подробная характеристика точек инсерции плазмидной ДНК в геном, включая описание изменений, произошедших в ходе амплификации, может служить дополнительным доказательством моноклональности линии-продуцента.

Методы: ПЦР-PB, секвенирование генома на платформах PromethION (Oxford Nanopore Technologies,) и HiSeq1500 (Illumina/Solexa), анализ данных секвенирования (с использованием ПО Minimap2, Samtools, Benchling, IGV), сборка генома клеточной линии (Canu, Pilon, QUAST).

Результаты: Проведена биоинформатическая обработка данных полногеномного секвенирования клональной линии-продуцента хорионического гонадотропина человека (ХГч), полученной на основе клеток CHO S и разработанных в лаборатории плазмид p1.2-GS-ahCG и p1.1-Tr2-hCG-BIA с промотором фактора элонгации EF-1a китайского хомячка. Поиск точек инсерции целевых плазмид осуществлялся при помощи трех методов: 1) отбор прочтений, обладающих гомологией одновременно к последовательности одной из плазмид и к участкам генома CHO; 2) сборка отдельных контигов на основе предварительно отфильтрованных прочтений, обладающих гомологией к последовательности одной из плазмид; 3) сборка полного генома клеточной линии с последующим исправлением ошибок на основе данных парноконцевого секвенирования. Было обнаружено, что амплификации подвергается участок размером примерно 3 млн. п.о. вокруг точки инсерции плазмиды p1.1-Tr2-hCG-BIA, а в случае инсерции плазмиды p1.2-GS-ahCG соединение последовательностей генома и плазмиды происходит через последовательности адаптерной ДНК. При этом большинство интегрированных в геном копий плазмид собраны в протяженные конкатемеры (для p1.1-Tr2-hCG-BIA максимальная длина гомополимера 8 копий, для p1.2-GS-ahCG — 4 копии), соединение копий происходит в области фрагментов длинного концевого повтора вируса Эпштейна-Барра (EBVTR) с делецией короткого участка на 3'-конце по схеме "tail-to-tail".

Выводы: Точки инсерции плазмидной ДНК, обнаруженные в ходе

ручного анализа предварительно отфильтрованных прочтений Nanopore были подтверждены данными парноконцевого секвенирования, а также путем сборки полного генома клеточной линии и отдельных контигов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект 125052006274-4).

**УСТРАНЕНИЕ УЗКИХ МЕСТ В ЭКСПРЕССИИ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ БЕЛКОВ
КУЛЬТИВИРУЕМЫМИ КЛЕТКАМИ КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА С
ПОМОЩЬЮ БИОИНЖЕНЕРИИ СЕКРЕТОРНОГО ПУТИ**

Орлова Н.А., Синегубова М.В., Колесов Д.Э., Ходак Ю.А., Воробьев И.И.

Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина ФИЦ Биотехнологии РАН

e-mail: nobiol@gmail.com

**ELIMINATION OF BOTTLENECKS IN THE EXPRESSION OF
BIOTECHNOLOGICALLY SIGNIFICANT PROTEINS BY CHINESE
HAMSTER OVARY CELLS THROUGH THE BIOENGINEERING OF THE
SECRETORY PATHWAY**

Orlova N.A., Sinegubova M.V., Kolesov D.E, Khodak Yu.A., Vorobiev I.I.

Center of Bioengineering, Research Center of Biotechnology RAS

Продукция рекомбинантных белков клетками китайского хомячка (CHO) представляет собой многоэтапный процесс, эффективность которого может ограничиваться на различных стадиях - от транскрипции гена до секреции зрелого белка в культуральную среду. В нашей лаборатории ранее были разработаны векторы, способствующие эухроматинизации участков встраивания трансгенов, и созданы клеточные линии, устойчивые к апоптозу и пригодные для длительного культивирования в режиме fed-batch. Однако, даже при наличии этих преимуществ, фактором, лимитирующим продуктивность, может

становиться эффективностью процессинга и секреции белка.

Увеличение скорости секреции проводилось путем выбора наилучших сигнальных пептидов или оверэкспрессии компонентов сигнал-узнающей частицы (SRP). Модельные белки - 4 гетеродимерных гормона – фолликулостимулирующий, лютеинизирующий, гонадотропный, тиреотропный (ФСГ, ЛГ, ХГ и ТТГ) и два антитела – сложное для экспрессии (DTE) и нормально экспрессирующееся (ETE). Тестировали 3 гетерологичных сигнальных пептида для гормонов (азуроцидин, альбумин человека, пептид их общей альфа-цепи) и 2 гетерологичных сигнальных пептида для антител. Для оверэкспрессии компонентов сигнал-узнающей частицы созданы конструкции, кодирующие SRP14 и SRP9 CHO под контролем конститутивного промотора.

Сигнальный пептид ЧСА увеличил удельную продуктивность на 60% для ХГ, в 4 раза для ЛГ и в 13 раз для ТТГ и не изменил продуктивность для ФСГ по сравнению с нативными сигнальными пептидами этих гормонов. В то же время, для DTE антитела смена сигнальных пептидов не оказывала значимого влияния на уровень экспрессии, а оверэкспрессия SRP14 приводила к увеличению выхода антител на порядок.

Модификация секреторного пути, включающая как подбор оптимальных сигнальных пептидов, так и оверэкспрессию ключевых компонентов SRP, представляет собой действенный инструмент для устранения узких мест в биопроизводстве рекомбинантных белков.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 25-24-00140.

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ
ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ rAAV ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ
АНТИТЕЛ *IN VITRO* И *IN VIVO***

Рябова Е.И., Довгий М.А., Деркаев А.А., Дмитриев О.Е., Есмагамбетов И.Б.

*ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и
микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства
здравоохранения Российской Федерации*

e-mail: riabchika@mail.ru, ryabovaei96@gmail.com

**COMPARATIVE EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF DIFFERENT
rAAV GENETIC CONSTRUCTS FOR *IN VITRO* AND *IN VIVO* ANTIBODY
EXPRESSION**

**Ryabova E.I., Dovgiy M.A., Derkaev A.A., Dmitriev O.E.,
Esmagambetov I.B.**

*The Federal Government Budgetary Institution «National Research Center for
Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F.
Gamaleya» of the Ministry of Health of the Russian Federation*

Введение. Пассивная генетическая иммунизация с использованием рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (rAAV) рассматривается как альтернатива традиционной вакцинации, особенно для групп риска с нарушенным иммунным ответом [1, 2, 3]. Этот подход основан на доставке гена антитела и его длительной экспрессии в организме, что позволяет формировать защиту без многократного введения белковых препаратов [4]. Одним из факторов, определяющих эффективность метода, является структура экспрессионной кассеты: промотор, интроны и форма генома (ssAAV или scAAV).

Цель. Целью данной работы являлось получить и сравнить эффективность трех вариантов AAV-конструкций, экспрессирующих ген антитела B11-Fc, специфичного к ботулиническому токсину типа А (BoNT/A).

Материалы и методы. В работе использовали молекулярно-

биологические методы, иммунологические и биотехнологические. Были сконструированы три варианта rAAV серотипа DJ, кодирующие модифицированное однодоменное антитело B11-Fc против ботулинического нейротоксина типа А (BoNT/A) [5]:

- **rAAV-CMV-B11-Fc** — одноцепочечный вектор с CMV-промотором и h β G интроном;
- **rAAV-CASI-B11-Fc** — вектор с композитным промотором CASI, включающим регуляторные элементы для усиленной транскрипции;
- **scAAV-CMV-B11-Fc** — самокомплементарный вектор с CMV-промотором и SV40 интроном.

Векторы получали в культуре клеток HEK293, очищали методом тангенциальной фильтрации и аффинной хроматографии. Экспрессию B11-Fc *in vitro* исследовали в линиях HEK293, CHO-S и C2C12 с использованием биослойной интерферометрии. Защитный эффект *in vivo* оценивали на модели ботулинической интоксикации у мышей BALB/c.

Результаты. В ходе работы были сконструированы и охарактеризованы три варианта rAAV-векторов серотипа DJ, кодирующих однодоменное антитело B11-Fc против ботулинического нейротоксина типа А (BoNT/A): rAAV-CMV-B11-Fc, rAAV-CASI-B11-Fc и scAAV-CMV-B11-Fc. Эффективность экспрессии гена антитела B11-Fc оценивали как *in vitro*, так и *in vivo*. Наибольшая продукция *in vitro* наблюдалась в клетках CHO-S после трансдукции rAAV-DJ-CMV-B11-Fc, достигая 69,2 мкг/мл на 144-й час. Вектор с промотором CASI показал повышенную экспрессию в миобластах C2C12 (до 19,5 мкг/мл), тогда как scAAV-DJ-CMV-B11-Fc обеспечивал средний уровень продукции в HEK293 и CHO-S и минимальный в C2C12 (Рисунок 1А).

В условиях *in vivo* (на модели мышей линии BALB/c) максимальная концентрация B11-Fc в сыворотке мышей, получивших rAAV-DJ-CMV-B11-Fc, превышала 250 мкг/мл к 120 суткам и сохранялась до 184 дней (Рисунок 1В). У животных, получивших rAAV-DJ-CASI-B11-Fc и scAAV-DJ-CMV-B11-Fc, уровень антител был значительно ниже. Протективный эффект всех трех

вариантов rAAV изучали на мышинной модели интоксикации ботулотоксином типа А. Однократное внутримышечное введение каждой конструкции в дозе 10^{11} гк на животное обеспечивало полную защиту от летальной дозы 10 LD₅₀ BoNT/A через 2 суток после введения, при этом защитный эффект сохранялся не менее 78 суток. Максимальный протективный эффект против BoNT/A *in vivo* наблюдался у конструкций rAAV-CMV-B11-Fc и rAAV-CASI-B11-Fc, которые на 78-е сутки обеспечивали защиту от 1000 и 800 LD₅₀ токсина соответственно. Эти данные подтверждают влияние генетической конструкции вектора на уровень и продолжительность экспрессии B11-Fc и эффективность пассивной иммунизации.

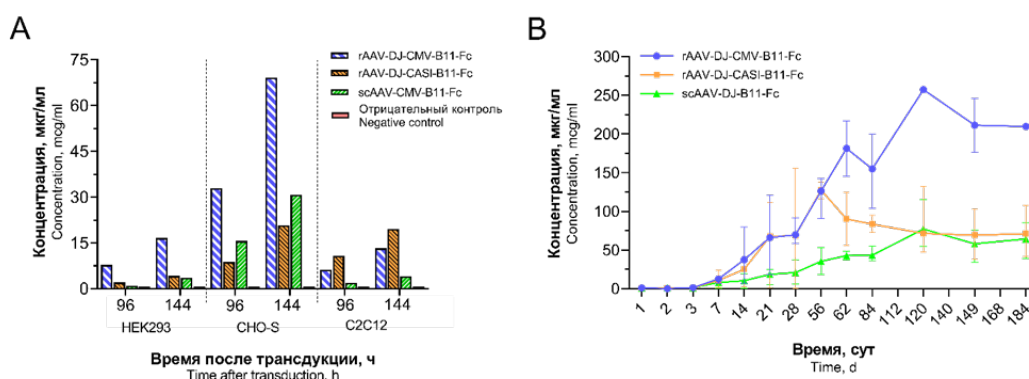


Рисунок 1 - Концентрация антител B11-Fc (мкг/мл): (А) в культуральной жидкости после трансдукции rAAV; (В) в сыворотке крови мышей, в различные промежутки времени после инъекции препаратов rAAV

Заключение. Результаты показывают, что вариации в конструкции экспрессионной кассеты rAAV определяют кинетику и уровень экспрессии антител *in vivo*. Векторы с промоторами CMV и CASI перспективны для долгосрочной профилактики. Проведенное исследование подтверждает значимость оптимизации дизайна rAAV при разработке платформ для пассивной генетической иммунизации.

Литература:

1. Travieso T. The use of viral vectors in vaccine development/ T.Travieso, J.

Li, S. Mahesh, J. D. F. R. E. Mello, M. Blasi, //npj Vaccines. – 2022. – Vol. 7. – №. 1. – P. 75.

2. Derkaev A.A. rAAV expressing recombinant neutralizing antibody for the botulinum neurotoxin type a prophylaxis / A.A. Derkaev, E.I. Ryabova, I.B. Esmagambetov [et al.] //Frontiers in Microbiology. – 2022. – Vol. 13. – P. 960937.

3. Esmagambetov I.B. rAAV expressing recombinant antibody for emergency prevention and long-term prophylaxis of COVID-19 / I.B. Esmagambetov, E.I. Ryabova, A. A. Derkaev [et al.] //Frontiers in Immunology. – 2023. – Vol. 14. – P. 1129245.

4. Ryabova E.I. The Use of Recombinant Adeno-Associated Virus for Passive Immunization and Protection against Infectious Diseases/ E.I. nRyabova, A.A. Derkaev, N.V. Pimenov, I.B. Esmagambetov //Molecular Genetics, Microbiology and Virology. – 2024. – Vol. 39. – №. 1. – P. 31-39

5. Godakova S. A. Camelid VHHs fused to human fc fragments provide long term protection against botulinum neurotoxin a in mice / S. A. Godakova, A. N. Noskov, I. D. Vinogradova [et al.] // Toxins. – 2019. – Vol. 11. – №. 8. – P. 464.

ПОЛУЧЕНИЕ СБАЛАНСИРОВАННОГО ПРОДУЦЕНТА ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК СНО ПРИ ПОМОЩИ ПАРЫ БИ- И ТРИЦИСТРОННЫХ ПЛАЗМИД

Синегубова М.В.^{1,3}, Воробьев И.И.¹, Орлова Н.А.¹, Клишин А.А.²,

Зырянов Д.А.², Ползиков М.А.³

¹*Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина ФИЦ Биотехнологии РАН*

²*ООО «Фармапарк»*

³*ООО «АйВиФарма»*

e-mail: mvsineg@gmail.com

OBTAINING A BALANCED PRODUCER OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN IN CHO CELL CULTURE USING A PAIR OF BI- AND TRI-CYSTRONE PLASMIDS

***Sinegubova M.V.^{1,3}, Vorobiev I.I.¹, Orlova N.A.¹, Klishin A.A.², Zyrianov D.A.²,
Pozikov M.A.³***

¹Center of Bioengineering, Research Center of Biotechnology RAS

²Pharmapark LLC

³IVFarma LLC

Цель данной работы – получение высокопродуктивной клеточной линии на основе клеток яичника китайского хомячка (*CHO*) для производства рекомбинантного хорионического гонадотропина человека (рХГч).

ХГч состоит из двух нековалентно связанных субъединиц – α и β , обильно гликозилирован, что делает гормон достаточно сложным объектом для экспрессии. В медицине препараты ХГч широко используются при применении вспомогательных репродуктивных технологий. Препараты рХГч, в отличие от препаратов ХГч мочевого происхождения, имеют ряд преимуществ: постоянство количественного содержания, высокую степень чистоты, стабильный состав связанных гликанов, отвечающих за биологическую активность рХГч.

Родительские клетки *CHO DG44* и *CHO S* трансфицировали плазмидами *p1.1-Tr2-HCG-AIB* *p1.1-Tr2-HCG-BIA* соответственно и получали стабильно трансфицированные популяции при действии метотрексата. Для балансировки уровней экспрессии двух субъединиц поликлональные популяции были повторно трансфицированы вспомогательными плазмидами, кодирующими дефицитную цепь: β -цепь (*p1.2-GS-bHCG*) или α -цепь (*p1.2-GS-aHCG*), после чего провели селекцию при помощи ингибитора глутаминсинтазы L-метионинсульфоксимины. Данным способом удалось повысить продуктивность клеток по гетеродимеру более чем в 2 раза. Клональная линия *S-pTr2-hCG-8* продемонстрировала титры более 100 мг/л при *fed-batch*-культивировании и поддерживала секрецию продукта стабильной в течение 60 генераций.

Исследование очищенного рХГч методом обращенно-фазовой ВЭЖХ подтвердило его соответствие референсному оригинальному препарату по составу гликоформ. Очищенный рХГч обладал биологической активностью, принимаемой равной 26 МЕ/мкг, определенной по методу *in vivo* на самцах крыс, описанному в Европейской фармакопее 01/2020:0498, в сравнении с международным стандартом ВОЗ (определенная активность 27,4 МЕ/мкг, 95% ДИ: от 18,9 до 40,5 МЕ/мкг).

Таким образом, разработанная линия клеток-продуцентов рХГч перспективна для использования в промышленном масштабе.

ПОДБОР УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *ESCHERICHIA COLI*, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК HPV

**Ячmeneва А.А.¹, Сычева В.С.¹, Плетюхина Ю.В.¹, Зверева В.А.¹,
Савельев Н.С.¹, Рабдано С.О.¹**

¹*Федеральное государственное унитарное предприятие "Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов" федерального медико-биологического агентства*
e-mail: a.a.yachmeneva@niivs.ru

SELECTION OF CULTIVATION CONDITIONS FOR *ESCHERICHIA COLI* EXPRESSING RECOMBINANT HPV PROTEIN

Yachmeneva A.A.¹, Sycheva V.S.¹, Pletyukhina Yu.V.¹, Zvereva V.A.¹, Savelev N.S.¹, Rabdano S.O.¹

¹*Federal State Unitary Enterprise St. Petersburg Research Institute of Vaccines and Serums and Bacterial Preparations Plant of Russian Federal Biomedical Agency*

Разработка вакцины против вируса папилломы человека (ВПЧ) считается актуальной задачей, поскольку ВПЧ вызывает значительную долю злокачественных новообразований, в том числе рак шейки матки. По данным

различных источников, рак шейки матки составляет около 5–7% от общей онкологической заболеваемости у женщин в России [1]. В настоящее время в стране применяются преимущественно импортные вакцины (Gardasil, Cervarix), что затрудняет широкую доступность профилактики.

Одним из ключевых условий эффективной разработки вакцинных препаратов является получение растворимого рекомбинантного белка, сохраняющего иммуногенную и нативную конформацию. В нашем исследовании использован штамм *Escherichia coli*, экспрессирующий капсидный белок L1 ВПЧ 16 типа, и проведён подбор условий культивирования, способствующих накоплению растворимого белка.

Процесс включал жидкофазное выращивание клеток в колбах, контроль оптической плотности (OD600), центрифугирование и ультразвуковое лизирование. Для оценки уровня экспрессии и растворимости белка применялись электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) и метод вестерн-блоттинга (Western blot). Обработка электрофореграмм осуществлялась с помощью программы “Image Lab”.

На рисунке 1 представлена электрофореграмма проб, полученных при культивировании штамма-продуцента, целевые бэнды отмечены значениями молекулярной массы. В качестве проб для анализа использовались образцы культуральной жидкости, которые отбирались до внесения индуктора и каждый час после, для отслеживания продукции рекомбинантного белка L1 HPV 16.

Для дальнейшего исследования и подтверждения того, что определяемый по электрофорезу белок, действительно является белком L1 HPV 16, был проведен анализ Western blot с соответствующими антителами к целевому белку. Результат определения белка L1 ВПЧ 16 методом Western blot представлены на рисунке 2.

Установлено, что снижение температуры культивирования до 30°C способствует получению белка преимущественно в растворимой форме. Наиболее высокая растворимость наблюдалась при использовании среды Terrific Broth (TB), при концентрации индуктора IPTG 1 mM. Повышение концентрации

IPTG свыше 1 mM вызывало снижение доли растворимого белка и образование нерастворимых агрегатов. Минеральные среды оказывали негативное влияние как на рост бактерий, так и на выход целевого продукта.

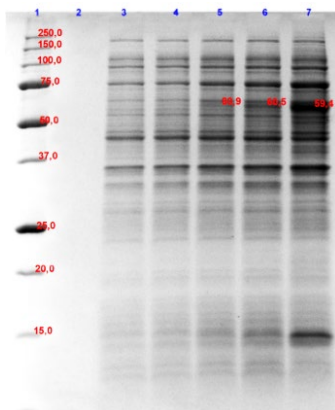


Рисунок 1 - Электрофорез проб, полученных при культивировании при $t=30^{\circ}\text{C}$ *E.coli* HPV 16, в 12,5% ПААГ (Молекулярная масса целевого белка составляет 55-60 кДа), (Легенда: 1 – маркер, 2 – 1x Laemmli буфер, 3 – до индукции, 4 – 1 час после индукции, 5 -2 час после индукции, 6 – 3 час после индукции, 7 –индукция после ночи (16 час))

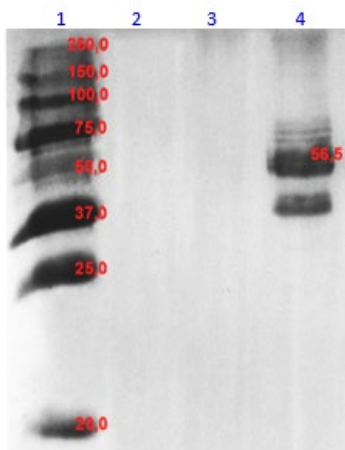


Рисунок 2 - Мембрана с перенесенными на нее белками и обработанная антителами к белку L1 HPV 16 (Легенда: 1 – маркер, 2, 3 – 1x Laemmli буфер, 4 дорожка – супернатант 30°C *E. coli* HPV 16)

Таким образом, замедление экспрессии путём снижения температуры до 30°C позволяет повысить растворимость рекомбинантного белка L1. При этом

выбранные условия культивирования способствуют накоплению белка в форме, потенциально пригодной для дальнейших стадий очистки и анализа.

Литература:

1. Сарыев М. Н. и др. Рак шейки матки в РФ и риски формирования вагинальных свищей //Хирургия и онкология. – 2021. – Т. 11. – №. 2. – С. 49-54.

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА ТАРГЕТНОГО МАСС-
СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА α И β ЦЕПЕЙ ГЕМОГЛОБИНА
В ЕДИНИЧНОМ ЭРИТРОЦИТЕ**

Вавилов Н.Э., Згода В.Г.

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени
В.Н. Ореховича», лаборатория системной биологии*

e-mail: n.vavilov95@gmail.com

**THE DEVELOPMENT OF TARGETED MASS SPECTROMETRY
ANALYSIS METHOD OF α AND β HEMOGLOBIN CHAINS IN A SINGLE
ERYTHROCYTE**

Vavilov N.E., Zgoda V.G.

Institute of Biomedical Chemistry

Цель: разработать высокочувствительный метод таргетного масс-спектрометрического анализа следовых количеств белка единичного эритроцита с использованием пептидов, меченных стабильными изотопами.

Актуальность: поиск новых подходов для высокопроизводительного анализа протеома единичных клеток – новое, активно развивающееся направление в протеомике. Основная проблема масс-спектрометрического протеомного анализа клеток в том, что полученные данные содержат информацию о средних арифметических уровнях содержания белка в большой популяции клеток, которая может содержать несколько типов клеток. Переход к измерению концентрации белка в единичных клетках позволит выявить новые механизмы регуляции экспрессии белков и возможно новые биомаркеры заболеваний и лекарственные мишени.

Методы: в качестве биологического объекта была использована венозная кровь человека, из которой получали обогащенную фракцию эритроцитов посредством центрифугирования при 500 g и последовательных отмывок

форменных элементов крови 50 мМ фосфатно-солевым раствором pH 7,4. Количество эритроцитов в полученном препарате было измерено в клеточном счетчике и проведен их лизис и ферментативный гидролиз трипсином. Был разработан метод таргетного масс-спектрометрического анализа белков эритроцита на приборе 6495 Triple Quad LC/MS (Agilent) с использованием изотопно-меченных пептидов в качестве внутренних стандартов.

Результаты: Центрифугирование цельной венозной крови при +4°C и 500 g с добавлением 50 мМ фосфатно-солевого буфера pH 7,4 позволило очистить эритроциты от сыворотки крови. Контроль чистоты препарата проводился с помощью масс-спектрометрического анализа белка альбумина, которые не был зарегистрирован ни в одном из образцов.

В ходе оптимизации методики были подобраны оптимальные параметры энергии соударения, ускоряющего потенциала ячейки и ширины изоляции для каждого перехода. Наиболее высокий уровень сигнала наблюдался при использовании наиболее широкого окна изоляции и для прекурсорного иона и для дочернего(wide-wide).

Разработанный метод позволил с высокой точностью измерить абсолютную концентрацию β -цепи гемоглобина, которая составила $3,1 \pm 0,13$ фмоль/клетку с коэффициентом вариабельности-4,3% в количестве материала, эквивалентном единичному эритроциту (Рисунок 1).

Выводы: предложенный метод позволяет провести абсолютный количественный анализ концентрации гемоглобина в образце белка, эквивалентном единичному эритроциту. Дальнейшая работа над усовершенствованием методики позволит детектировать α -цепь гемоглобина и другие, менее распространенных белки эритроцитов. В случае успеха методика может быть использована для исследования широкого перечня типов клеток и тканей человека для поиска новых биомаркеров, лекарственных мишеней, изучения механизмов регуляции экспрессии генов и дифференцировки клеток.

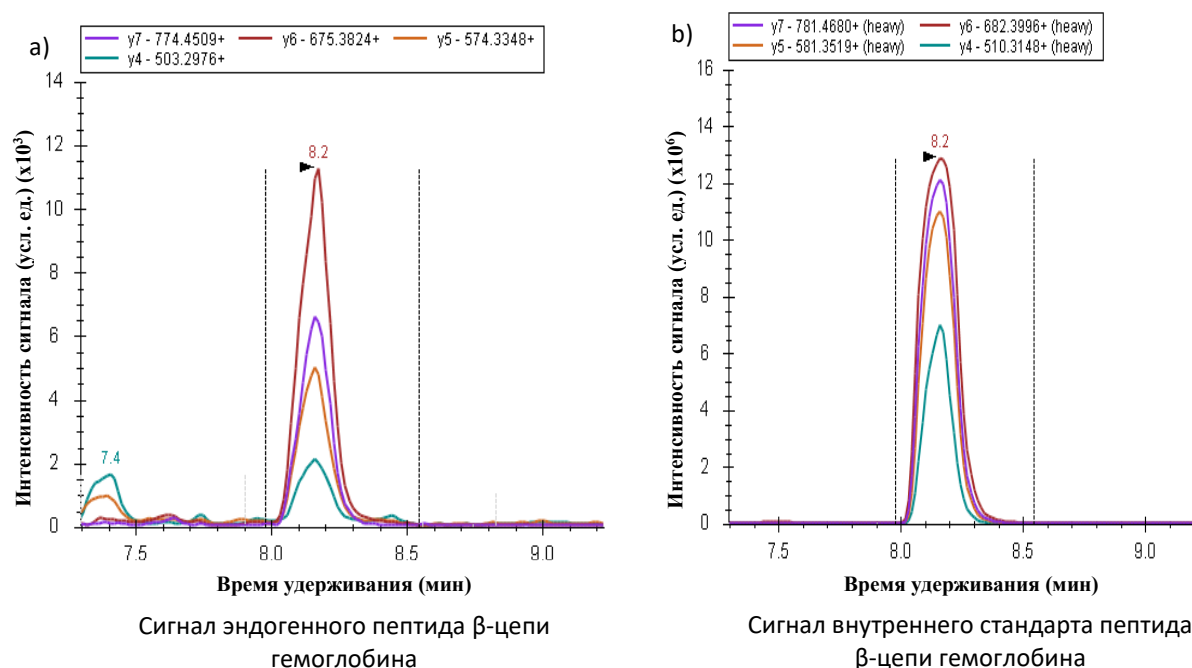


Рисунок 1 - Масс-спектрометрический сигнал дочерних ионов эндогенного пептида (а) и внутреннего изотопно-меченного пептидного стандарта (b) белка β -цепи гемоглобина в единичном эритроците.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№122030100168-2).

РАЗРАБОТКА МЕТОДА АНАЛИЗА ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Каргополов И.А.

АО «ГЕНЕРИУМ»

e-mail: kargopolov@generium.ru

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD FOR LYSOSOMAL FERMENTS GLYCOSYLATION

Kargopolov I.A.

JSC «GENERIUM»

Контроль гликопрофиля лекарственных препаратов на основе лизосомальных ферментов – нетривиальная аналитическая задача, ввиду наличия нескольких сайтов гликозилирования. Были проведены исследования профиля N-гликанов рекомбинантной человеческой N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы (галсульфазы). При разделении гликанов галсульфазы на хроматографической колонке в режиме гидрофильных взаимодействий (HILIC), пики гликанов из разных функциональных групп выходят вперемешку и частично перекрываются. В профиле также присутствуют фосфорилированные гликаны, которые могут связываться с металлическими поверхностями хроматографического тракта и примесями металлов в сорбентах колонок, что занижает оценки их содержания. Ранее был предложен метод разделения гликанов фермента бета-глюкуронидазы на отдельные группы: нейтральные, сialiрированные, фосфорилированные и гибридные в смешанном режиме обращеннофазной/анионообменной ВЭЖХ [1]. При этом зерна сорбента и стенки колонки были покрыты слоем инертного полимера для подавления вторичных взаимодействий. Однако для пробоподготовки в статье использовали коммерческий набор GlycoWorks с красителем RapiFluor-MS (Waters), который может быть доступен не всем лабораториям. Это приводит к необходимости разработки отдельной методики из-за ограниченной применимости предлагаемых в литературе протоколов анализа.

Разработан способ пробоподготовки гликанов галсульфазы с применением широкодоступных реактивов и материалов. Экспериментально установлены подходящие параметры пробоподготовки на стадиях дегликозилирования белка, окрашивания гликанов и очистки от избытка красителя.

PNGase F может неравномерно снимать гликаны с разных сайтов гликозилирования, это зависит как от структуры белка, так и от нагрузки PNGase F. Для более быстрой и точной оценки содержания гликанов белок можно предварительно денатурировать нагреванием с добавлением детергентов и/или восстановителей дисульфидных связей. Галсульфазу достаточно погреть 10 мин при 99°C, а затем добавить 2 мЕД PNGase F на 50 мкг белка, чтобы снять все

гликаны за 10 мин при 50°C.

Для окрашивания отщепленных гликанов их окисляли до альдоз уксусной кислотой. В кислой среде также запускается побочная реакция десиалирования сиалированных гликанов, что снижает оценку их содержания со временем. Чтобы быстрее покрасить все гликаны и не потерять сиалированные, мы увеличили нагрузку антраниламида (2-AB) до 5 мг на 50 мкг белка, инкубировали пробы 10 мин при 50°C. Для стабилизации окрашенных гликанов в пробы также добавляли малотоксичный 2-пиколин боран (5 мг).

Перед анализом пробы нужно тщательно очистить от несвязанной краски, чтобы ее пики не мешали обработке результатов. Популярным способом очистки гликанов является твердофазная экстракция на гидрофильных сорбентах, но также используется жидкофазная экстракция ацетоном или ацетонитрилом. При добавлении органического растворителя более 90% по объему, гликаны осаждаются центрифугированием при 10000 g за 5 мин. После очистки стоит удалить остатки органического растворителя из пробы, иначе пики гликанов деформируются при анализе.

Анализ проводили на биоинертной системе Acquity Arc Bio (Waters) с колонкой XBridge Premier Glycan BEH C18 AX, размер 2.1x150 мм, размер зерна 2.5 мкм (Waters). ПФ А - 50 mM формиат аммония pH 4.5 в 60 % ацетонитриле, ПФ Б - вода, разделяющий градиент - 2-25 % ПФ Б с 1 по 45 мин, температура колонки 60 °C. Содержание разделенных гликанов оценивали по флуоресценции на длинах волн 350/430 нм. Идентификацию гликанов в режиме ESI- проводили с помощью масс-спектрометра Orbitrap Q Exactive HF (Thermo Scientific) [2].

Метод позволил оценить отдельные группы нейтральных (N), монофосфорилированных (P1), бифосфорилированных (P2) и сиалированных (S1, S2, S3) гликанов галсульфазы (рис. 1). Методика анализа с некоторыми доработками применима к различным образцам ферментных препаратов.

Из-за адсорбции колонкой ионных примесей пики фосфорилированных гликанов постепенно теряют разрешение и эффективность. Примерно за 10-15 ч промывания колонки буферным раствором 50 mM формиата аммония с

добавлением 10 мМ Трилон Б (ЭДТА динатрия) параметры всех пиков возвращаются к исходным значениям.

Подобраны условия анализа, дающие воспроизводимые, точные и устойчивые результаты по содержанию всех групп гликанов галсульфазы (табл. 1).

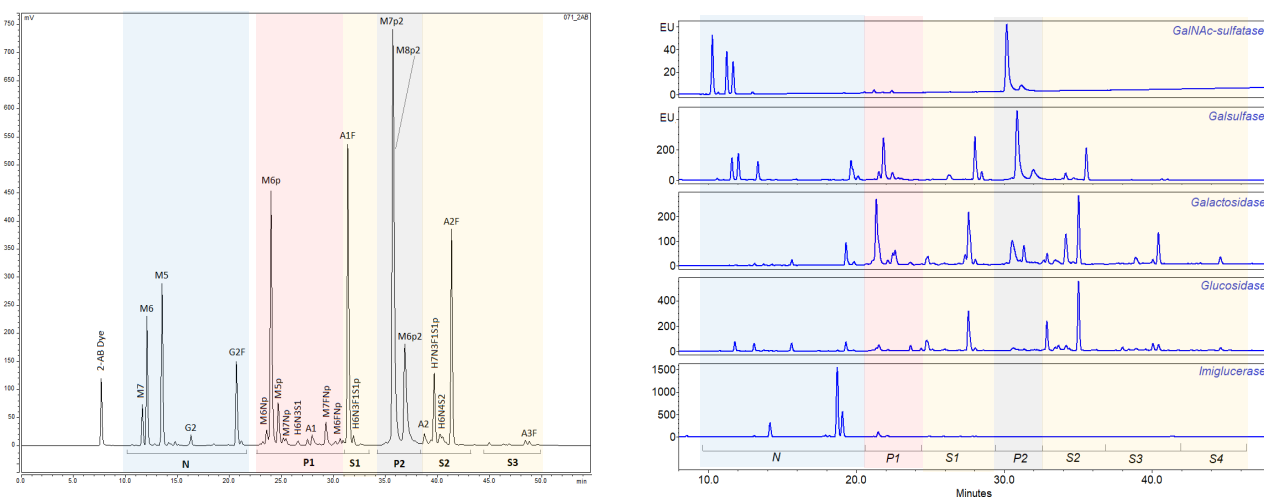


Рисунок 1 - Гликопрофиль галсульфазы в режиме RP/AX (слева) и профили гликанов прочих лизосомальных ферментов (справа)

Таблица 1 - Валидация методики анализа гликанов галсульфазы

Характеристика	Результаты	RSD содержания групп гликанов, %
Специфичность	В растворе плацебо отсутствуют пики в области выхода пиков гликанов.	-
	Три последовательных инъекции СО (RSD удерживания пиков, мин: < 0,1 %)	от 0,1 до 0,3
	Три инъекции разных серий галсульфазы	2,2 - 6,6
Линейность	Диапазон разведений 10-120%, $r^2 = 0,998$	0,7 - 3,2
Повторяемость	Шесть независимых пробоподготовок	0,2 - 0,8
Межлабораторная прецизионность	По шесть независимых пробоподготовок, сделанных двумя химиками в двух лабораториях	2,2 - 7,8
Устойчивость	Хранение проб при 2-8 °С в течение 40 ч	0,1 - 0,8
	Смещение в течение первых 160 инъекций	1,5 - 4,5
	Смещение до и после регенерации колонки	1,0 - 2,5

Литература:

1. Liu X., Wang Q., Lauber M.A. J. Chrom. B. 2022. Vol. 1191. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123120>
2. Aich U., Saba J., Liu X., et al. Thermo Scientific AN 20827. 2016.

**КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ СПОСОБ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ**

Киселева А.А.¹, Герасимова Т.С.¹, Гусаров Д.А.¹, Луценко И.А.²

¹ООО ГЕРОФАРМ, научно-исследовательский отдел

²ФГБУН «Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН»,
лаборатория химии координационных полиядерных соединений

e-mail: kiselevahimik@mail.ru

**CAPILLARY ELECTROPHORESIS AS A PROMISING METHOD FOR
DETERMINING ENZYME ACTIVITY**

Kiseleva A.A.¹, Gerasimova T.S.¹, Gusarov D.A.¹, Lutsenko I.A.²

JSC GEROPHARM

*N.S. Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Russian Academy of
Sciences*

Карбоксипептидаза – фермент класса гидролаз, который активно применяется на биофармацевтических предприятиях при производстве инсулина и его аналогов. Точность аналитического метода определения активности энзима является важной задачей, так как именно по значению активности рассчитывается масса фермента необходимая для правильного протекания реакции энзимолиза в производственном процессе.

Для определения активности ферментов широкое распространение получили спектрофотометрические методы анализа, имеющие не высокую

точность и низкую прецизионность [1], по сравнению с капиллярным электрофорезом (КЭ), который в последние годы приобретает все большую популярность в фармацевтической и биотехнологической промышленности, благодаря скорости, наглядности, точности, высокой разрешающей способности и экономичности метода [2].

Цель данной работы - разработка аналитической методики, обеспечивающей более высокую точность и правильность определения активности карбоксипептидазы.

Для подбора фонового электролита для разрабатываемой методики использовали 12 экспериментальных буферных растворов различного состава, которые условно можно разделить на 2 группы: 1) Кислые буферные растворы с рН менее рI фермента – классический капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) – движение положительно заряженного фермента по капилляру происходит под действием электрического тока; 2) Щелочные буферные растворы с рН более рI фермента - движение отрицательно заряженного фермента по капилляру осуществляется за счет сильного электроосмотического потока (ЭОП).

Анализ проводили на системе Капель 105 М (Люмекс, Россия) оснащенной спектрофотометрическим детектором и кварцевым капилляром с геометрией $L_{\text{общ}}/L_{\text{эфф}}$ 40/30 и $d = 50$ мкм. Условия анализа: $t = 25$ °С, $\lambda - 280$ нм, ввод пробы при 30 мбар – 5 с, $U - 15$ кВ, время анализа 10 мин, время миграции фермента около 5,5 мин. Активность карбоксипептидазы в испытуемом образце определяли путем сравнения площади пика фермента в образце с площадью пика стандартного образца (СО) с утвержденной активностью.

Применение кислых буферных растворов в качестве фоновых электролитов для КЗЭ показало отрицательные результаты – отсутствие пиков или широкие неинформативные пики [3]. Распределение молекул за счет ЭОП показало наилучшие результаты, из тестируемых щелочных фоновых электролитов лучшая селективность наблюдалась при использовании 40 мМ фосфатного буфера с рН 7,1 именно он и был выбран для разработки методики.

Методику валидировали [4] и апробировали на лиофилизатах

карбоксипептидазы собственного производства ООО ГЕРОФАРМ. На электрофореграммах регистрируется основной пик карбоксипептидазы и примесные белки, которые влияют на активность фермента (рис. 1. а, б). Методика линейна - график зависимости площади пика от концентрации имеет линейный характер в аналитической области методики от 0,1 до 1,2 г/л с коэффициентом линейной регрессии $r = 0,9985$, который соответствует критерию приемлемости $r \geq 0,995$ (рис. 2). Подтверждена специфичность методики на близкородственной примеси карбоксипептидазы, похожей по аминокислотной последовательности с активностью 0 ЕД (рис, 1. в).

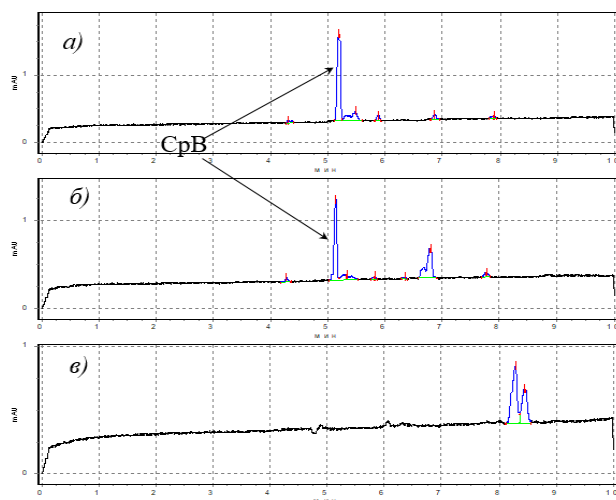


Рисунок 1 - Электрофореграммы:
а) СО карбоксипептидазы; б)
испытуемый образец; в)
близкородственная примесь

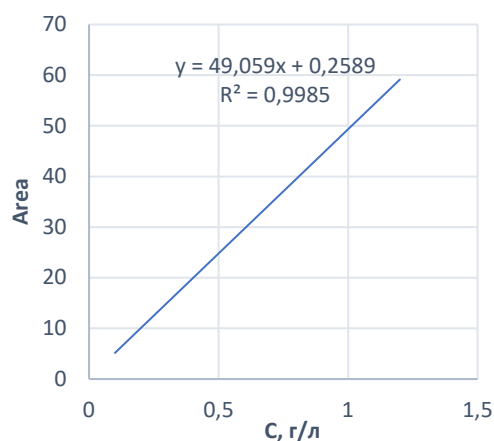


Рисунок 2 - Линейность
методики

По площади пика СО определена активность фермента в испытуемых образцах (табл. 1), полученные результаты коррелировали с результатами, полученными по утвержденной спектрофотометрической методике, коэффициент корреляции $R < 10\%$.

Таблица 1 - Результаты определения активности карбоксипептидазы

№	Чистота, %	Площадь пика	Ожидаемая активность, ЕД	Фактическая активность, ЕД	R, %
1	77,98	54,25	99,75	103,7	3,96
2	76,42	64,15	125,0	122,63	1,90
3	68,41	48,67	92,67	100,3	8,23
4	39,23	25,56	48,67	52,66	8,20
5	49,78	35,27	66,6	70,21	5,42

Разработан более легкий, быстрый, наглядный и менее трудозатратный метод определения активности карбоксипептидазы при помощи капиллярного электрофореза. Данная методика обеспечивает сопоставимые результаты и позволяет значительно повысить точность получаемых данных, благодаря чему снижается количество отклонений в ходе внутрипроизводственного контроля при производстве карбоксипептидазы и на технологических стадиях производства инсулинов.

Литература:

1. Государственная фармакопея РФ. XIV изд. Т. 1. – М., 2018. – С. 1814.
2. A. Vinther, K. Adelhorst, O. Kirk // Electrophoresis. – 1993. – Vol. 14. No. 5-6. – P. 486-491.
3. Киселева А.А., Герасимова Т.С., Гусаров Д.А., Луценко И.А. / БФЖ. 2025. Т. 17. № 1. С. 25-30.
4. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). ICH. 2005. 13 p.

**IN VITRO ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ RDH12
ГЕНОЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ АМАВРОЗА ЛЕБЕРА 13 ТИПА**

Павлова П.А., Аверина М.В., Панферов Е.В., Иванов Р.А.,

Карабельский А.В., Минская Е.С.

*АНОО ВО Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр
трансляционной медицины*

e-mail: minskaya.es@talantiuspeh.ru

**IN VITRO TEST SYSTEM FOR THE ASSESSMENT OF EFFICACY OF THE
RDH12 GENE REPLACEMENT THERAPY FOR LCA13**

Pavlova P.A., Averina M.V., Panferov E.V., Ivanov P.A., Karabelsky A.V.,

Minskaia E.S.

Sirius University of Science and Technology, Center for Translational Medicine

Наследственные дистрофии сетчатки затрагивают около 2 миллионов людей в мире. Амавроз Лебера (LCA) составляет около 5% наследственных ретинопатий и встречается с частотой от 1:81 000 до 1:30 000. [1,2] LCA 13 типа, ассоциированный с мутациями в гене RDH12, который кодирует фермент ретинол дегидрогеназу 12, составляет до 10% этих заболеваний. Отсутствие функциональной активности этого фермента приводит к нарушению процессов восстановления хромофора фоторецепторов, а также способствует накоплению токсичных метаболитов, что вызывает повреждение светочувствительных клеток сетчатки и приводит к преждевременной утрате зрения. [3] Нокаутные по гену RDH12 *in vivo* модели не отражают фенотипическую картину заболевания, поскольку у мышей с таким нокаутом не наблюдается дегенерации сетчатки из-за различий в метаболизме продуктов ретиноидного цикла. Поэтому первичное подтверждение эффективности генотерапевтических препаратов необходимо проводить *in vitro*.

Цель работы: Разработка *in vitro* тест-системы для оценки эффективности генозаместительной терапии RDH12-ассоциированных заболеваний сетчатки.

Для разработки тест-системы и моделирования заболевания были созданы

три коровые плазмиды: плазида, которая кодирует флуоресцентный белок GFP и RDH12 дикого типа, соединенные через саморезующийся пептид T2A (GFP_T2A_RDH12wt); плазида с мутацией p.Thr155Ile в RDH12wt (RDH12mut) и плазида со стоп-кодоном в позиции +1 RDH12 (RDH12_TAA). Ко-экспрессия GFP и RDH12 была подтверждена проточной цитометрией и микроскопией по экспрессии GFP (43,8% GFP-положительных клеток) и вестерн блоттингом с анти-RDH12 антителом после трансфекции адгезионных HEK293 (рис. 1.A). Статистическая обработка результатов исследования выполнена методами Shapiro-Wilk normality test, One-way ANOVA, KruskalWallis test - (****) $p\text{-val} < 0,0001$, (***) $p\text{-val} < 0,001$, (**) $p\text{-val} < 0,01$, (*) $p\text{-val} < 0,05$, (ns) $p\text{-val} > 0,05$, с помощью программы GraphPad Prism9.

В рамках исследования был проведен сравнительный анализ эффективности трансдукции клеток HEK293 тремя серотипами адено-ассоциированного вируса (rAAV): 5, PHP.S и 7m8, доставляющими GFP-T2A-RDH12wt, с помощью проточной цитометрии (рис.1). Через 48 и 120 часов после трансдукции выявлено увеличение процента GFP+ клеток при трансдукции 30 тыс. MOI серотипом AAV7m8 в 16 и 9 раз, а при 60 тыс. MOI в 9 и 5 раз по сравнению с серотипами AAV5 и AAV.PHP.S, соответственно.

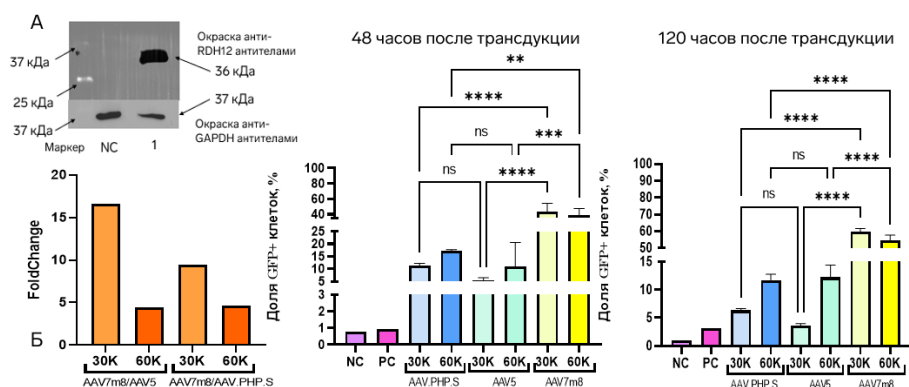


Рисунок 1 - Подтверждение экспрессии RDH12(A) и оценка эффективности трансдукции rAAV трёх серотипов на клетках HEK293 после 48 часов и 120 часов с помощью проточной цитометрии (Б)

Оценка цитотоксического эффекта при воздействии 4-HNE проводилась на клетках HEK293 и ARPE-19 через 24 часа после его внесения при помощи

проточной цитометрии с PI и препаративной окраски ядер клеток DAPI. Анализ количества мертвых клеток после обработки 4-HNE в количествах 100 и 120 мкмоль показал, что количество PI+ клеток было в 1,5 и 1,7 раза выше, соответственно, по сравнению с контролем. При окраске DAPI после внесения 120 мкмоль 4-HNE размер ядер уменьшился на 32%, а округлость - на 3%. (рис. 2)

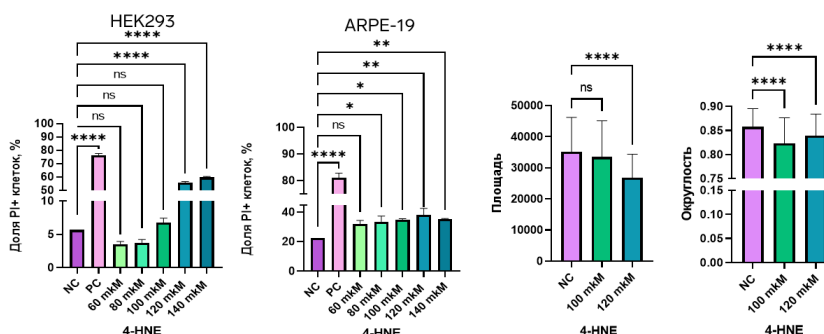


Рисунок 2 - Оценка цитотоксического эффекта от воздействия 4-HNE на клетки HEK293 и ARPE-19.

AAV7m8 оказался самым эффективным серотипом для доставки RDH12. Эффективность препарата будет оцениваться по более высокому проценту живых GFP+ клеток, экспрессирующих RDH12wt, при воздействии 4-HNE по сравнению с клетками, экспрессирующими RDH12_TAA или RDH12mut. Такая тест-система позволит оценить эффективность терапии до проведения *in vivo* исследований.

Литература:

1. Sather III R. et al. The clinical findings, pathogenic variants, and gene therapy qualifications found in a Leber congenital amaurosis phenotypic spectrum patient cohort //International journal of molecular sciences. – 2024. – Т. 25. – №. 2. – С. 1253;
2. Huang C. H. et al. Leber's congenital amaurosis: current concepts of genotype-phenotype correlations //Genes. – 2021. – Т. 12. – №. 8. – С. 1261;
3. Varela M. D. et al. Leber congenital amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy: current management and clinical trials //British Journal of Ophthalmology. – 2022. – Т. 106. – №. 4. – С. 445-451.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИММУНОГЕННАЯ ОЦЕНКА N-БЕЛКА *HANTAAN ORTHOHANTAVIRUS* ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ
Андреева Н.Ю., Мартынова Е.В., Давидюк Ю.Н., Насыров Т.Р., Хайбуллина С.Ф., Ризванов А.А., Кабве Э.

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт
фундаментальной медицины и биологии
e-mail: natasha_andreeva_2000@mail.ru*

OBTAINING AND IMMUNOGENIC EVALUATION OF *HANTAAN ORTHOHANTAVIRUS* N-PROTEIN FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME
Andreeva N. Y., Martynova E. V., Davidyuk Y. N., Nasyrov T. R., Khaibullina S. F., Rizvanov A. A., Kabwe E.

Kazan (Volga Region) Federal University

Актуальность: Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), вызываемая ортохантавирусами, остаётся значимой проблемой в эндемичных регионах РФ. Большинство случаев ГЛПС обусловлено вирусом Пуумала, тогда как вирус Хантаан выявляется значительно реже, но ассоциирован с более тяжёлым течением заболевания и повышенной летальностью [1]. N-белок является первым белком, синтезируемым после инфицирования и основным антигеном, используемым в диагностических тестах для обнаружения антител к ортохантавирусу [2]. Получение N-белка может быть полезным для разработки средств диагностики и лечения ГЛПС.

Целью данного исследования явилось получение иммуногенного N-белка *Hantaan orthohantavirus* (HTNV) с использованием метода экспрессии в *Escherichia coli*.

Методы: Открытую рамку считывания (ORF) S-сегмента вируса HTNV,

кодирующую N-белок, синтезировали и клонировали в плазмидный вектор pET-28a(+). ORF экспрессировали в *Escherichia coli* штамма BL21(DE3)pLysS, после чего проводили ультразвуковой лизис клеток бактерий. Нерастворимые агрегаты N-белка солюбилизировали в денатурирующем буфере, рефолдировали в диализном буфере и очищали на колонке с использованием аффинной хроматографии. Очищенный рекомбинантный N-белок (rN-белок) использовали для выявления IgG в сыворотке больных ГЛПС, вызванной вирусами HTNV и *Puumala orthohantavirus* (PUUV).

Результаты: В результате экспрессии rN-белка и обработки *E. coli* ультразвуком осадок все еще содержал основную массу целевого белка. В дальнейшем rN-белок был извлечен из осадка нерастворимых агрегатов (рисунок 1).

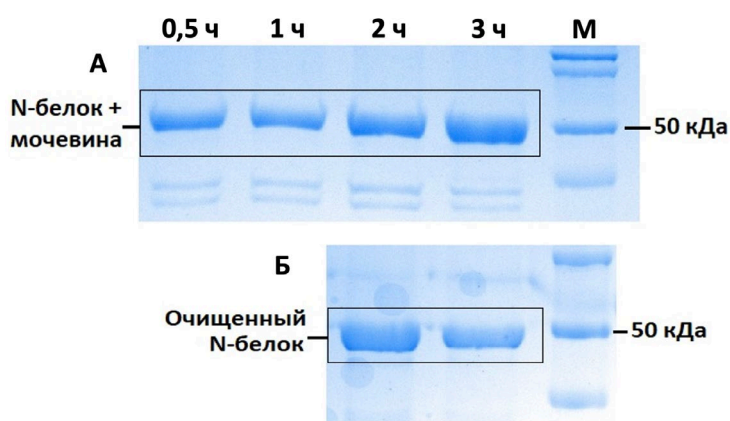


Рисунок 1 - (А) SDS-PAGE-анализ растворимой фракции белка после денатурации (инкубация в мочеvine 0,5ч–3ч). (Б) Очищенные фракции rN-белка

Было показано, что инкубации осадка в 2М мочеvine в течение 2-3 часов достаточно для высвобождения rN-белка из агрегатов в растворимую форму (рисунок 1). Данный результат представляет собой интерес, поскольку в прошлых работах по получению N-белка вируса PUUV для полного выхода белка в раствор требовалась инкубация в 8М мочеvine в течение как минимум 8 часов [3].

Была проведена оценка иммуногенности очищенного rN-белка HTNV методом иммуноферментного анализа (ИФА). IgG в сыворотках больных ГЛПС, вызванной вирусом HTNV, положительно реагировали с rN-белком HTNV в ИФА, в то время как контрольные образцы оставались отрицательными (рисунок 2). Также была проведена оценка перекрестной иммунореактивности rN-белка HTNV и IgG в сыворотках больных, зараженных вирусом PUUV. Сыворотки больных вирусом PUUV положительно реагировали с rN-белком HTNV в ИФА (рисунок 2). Таким образом, продемонстрирована кросс-реактивность IgG больных PUUV с N-белком HTNV.

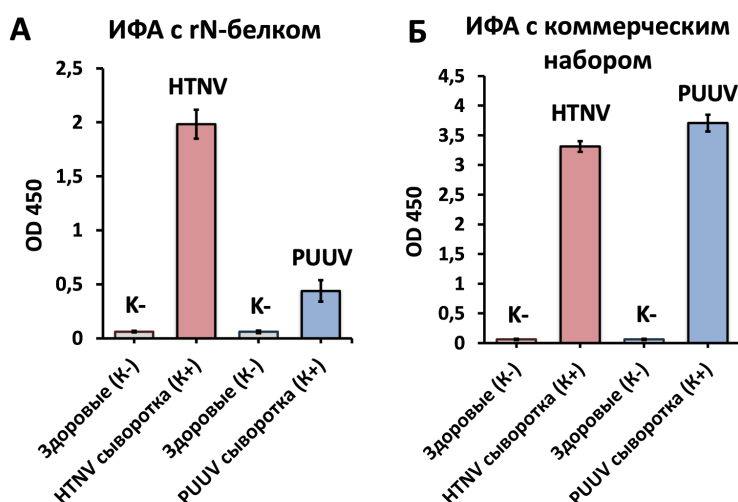


Рисунок 2 - ИФА с сыворотками больных ГЛПС, вызванной вирусами HTNV или PUUV. (А) ИФА с rN-белком. (Б) ИФА с коммерческим набором

Выводы: Подобраны оптимальные условия для экспрессии rN-белка HTNV в *E. coli* (20 ч, 20°C, 0,5 мМ ИПТГ), для солюбилизации из нерастворимых агрегатов в денатурирующем буфере (100 мМ Трис-НСl, 2М мочеви́на, 5 мМ ЭДТА) и рефолдинга в диализном буфере (50 мМ Трис-НСl, 0,5 М аргинин). rN-белок HTNV обладает иммуногенностью по отношению к сывороткам больных ГЛПС, зараженных вирусами HTNV или PUUV. Наблюдаемая перекрестная реактивность N-белка HTNV с PUUV может быть использована для создания универсального диагностического набора и субъединичной вакцины против ГЛПС.

Литература:

1. Sehgal A., Mehta S., Sahay K. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Asia: history, pathogenesis, diagnosis, treatment, and prevention // *Viruses*. 2023. Vol. 15. P. 561.
2. Jiang H., Zheng X., Wang L. Hantavirus infection: A global zoonotic challenge // *Virol. Sin.* 2017. Vol. 32. P. 32–43.
3. Andreeva N., Martynova E., Elboeva P. Recovering immunogenic orthohantavirus Puumalaense N protein from pellets of recombinant *Escherichia coli* // *Vaccines*. 2025. Vol. 13. P. 744.

АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КАЛЛУСОВ И НАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ СОЛОДКИ

Ермошин А.А., Лотоцкий С.О., Матыков Н.Е., Киселёва И.С.

Уральский федеральный университет, кафедра экспериментальной биологии и биотехнологий

e-mail: Alexander.Ermoshin@urfu.ru

ANTIOXIDANT POTENTIAL OF CALLI AND NATIVE PLANTS OF LICORICE

Ermoshin A.A., Lototsky S.O., Matykov N.E., Kiseleva I.S.

Ural Federal University

Солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L.) – одно из наиболее известных лекарственных растений, действующим веществом которого являются сапонины и флавоноиды. В первую очередь солодка известна, как средство при заболеваниях дыхательных путей, однако для флавоноидов из листьев и корней показаны противовирусная, иммуномодулирующая, противодиабетическая,

противовоспалительная и ряд других активностей [1, 2]. В ряде регионов она занесена в Красные книги, что делает затруднительным ее сбор. Солодку можно культивировать, однако выращивание многолетних лекарственных растений требует отчуждения на длительное время сельскохозяйственных земель. В связи с этим перспективным становится культивирование солодки *in vitro*.

Фенольные соединения в целом и флавоноиды в частности широко распространены в растениях, в том числе в солодке, особенно в надземных органах. Для них показана разнообразная биологическая активность. В последнее время внимание уделяется их антиоксидантной активности, в частности именно со способностью тушить свободные радикалы, связывать активные формы кислорода и азота, связывают противовоспалительную и стресс-протекторную активности природных фенольных соединений [2]. Эти факты показывают актуальность нашей работы.

Цель работы - получение каллусной культуры из листьев солодки голой, характеристика спектра фенольных соединений в полученных из нее экстрактах и определение их антиоксидантной активности *in vitro*.

Каллус индуцировали из листовых эксплантов на среде МС с 3% сахарозы на сочетании гормонов 1 мг/л БАП и 10 или 20 мг/ НУК [3]. Из каллусов, а также нативных листьев и корней этого же генотипа солодки готовили этанольный экстракт. Определяли спектрофотометрически антирадикальную активность по связыванию ABTS⁺- радикала, ингибирование образования оксида азота в реакции с нитропруссидом натрия, общий восстановительный потенциал по образованию молибденовой сини, содержание фенольных соединений с реактивом Фолина-Чокольтеу и карбонатом натрия, в пересчете на галловую кислоту, флавоноидов – по реакции с хлоридом алюминия, в пересчете на рутин [3].

Показано, что экстракты из нативных листьев солодки наиболее богаты фенольными соединениями (29.7 мг/г сухой массы) в сравнении с каллусами из листовых эксплантов (1.9–4.5 мг/г) и корнями (3.6 мг/г). Однако по общему содержанию фенольных веществ каллусные культуры были сопоставимы с

экстрактами из корней, которые являются официальным сырьем. В то же время, с увеличением концентрации ауксинов в среде культивирования содержание фенольных соединений заметно снижалось (в 2.5 раза). Суммарное содержание флавоноидов различалось в трех типах экстрактов. В корнях оно было выше (14.5 мг/г), чем в надземных органах (10.0 мг/г), а в каллусах меньше, чем в корнях и листьях (3.4–7.1 мг/г).

Антиоксидантная активность, выраженная как общая восстановительная способность, в 2–3 раза была выше в листьях, чем в корнях и каллусах. По этому показателю экстракты каллуса были сходны с экстрактами корней, но не листьев. В экстрактах из каллуса, выращенного с добавлением 10 мг/г НУК, эта активность была выше, чем в случае 20 мг/г НУК. Экстракты каллусов, полученные при разных концентрациях НУК, не отличались от экстракта корней и несколько превосходили экстракт листьев по способности ингибировать образование ABTS-радикала. При этом каллусные культуры уступали как листьям, так и корням по способности ингибировать образование оксида азота. Антиоксидантная активность, выраженная как общая восстановительная способность, в 2–3 раза была выше в листьях, чем в корнях и каллусах. По этому показателю экстракты каллуса были сходны с экстрактами корней, но не листьев. В экстрактах каллуса, выращенного с добавлением 10 мг/г НУК, эта активность была выше, чем в случае 20 мг/г НУК. (таблица).

Таким образом, экстракты каллусов, полученные при разных концентрациях НУК, не отличались от экстракта корней и несколько превосходили экстракт листьев по способности ингибировать образование ABTS-радикала. При этом каллусные культуры уступали как листьям, так и корням по способности ингибировать образование оксида азота. По содержанию фенольных соединений каллусные культуры больше похожи на корни (официальное сырье), чем на листья (источник первичного экспланта).

**Таблица - Состав и антиоксидантная активность экстрактов из органов
солодки и её каллусов**

Образец	Фенолы , мг/г	Флавоноиды, мг/г	Восстановительный потенциал, %	Ингибирование ABTS-радикала, %	Подавление продукции NO, %
Листья	29.7±0.8 [*]	10.0±0.3	1160 ± 91 [*]	84.5 ± 10	38 ± 3
Корень	3.6±0.1 ^х	14.5±0.7	550 ± 30 ^х	92.8 ± 0.1	37 ± 3
Каллус (НУК 10 мг/л)	4.5±0.1 ^х	7.1±0.1	585 ± 31 ^х	91.9 ± 0.1	17 ± 2 ^{х*}
Каллус (НУК 20 мг/л)	1.9±0.1 ^х	3.4±0.1 ^{х*}	340 ± 20 ^{х*}	92.7 ± 0.2	22 ± 2 ^{х*}

х – отличия от листа достоверны при $p < 0,05$; * - отличия от корня при $p < 0,05$

Литература

1. Kao T.C., Wu C.H., Yen G.C. J. Agricult. Food Chem. 2014. V. 62. P. 542.
2. Wahab S., Annadurai S., Abullais S., Das G. et al. Plants. 2021. V. 10. P. 2751.
3. Ермошин А.А., Киселева И.С., Галишев Б.А. Физ.Раст. 2024. Т. 71. Вып. 1. С. 159 – 168.

**МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ИММУНОПАТОГЕНЕЗА
ДЕРМАТОМИОЗИТА**

Киреев Б. В.^{1,2,3}, Никитич А. А.^{1,3}, Соколов В. В.^{3,4}, Песков К. В.^{1,3,4},

Волкова А. А.^{3,4}

¹*ФГОАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва,*

²*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва*

³*ФГБУН «Институт вычислительной математики им. Г.И. Марчука» РАН,
Москва,*

⁴*ООО «СимургФарм», Москва*

e-mail: kireev_b_v@staff.sechenov.ru

**MATHEMATICAL MODEL OF THE IMMUNOPATHOGENESIS OF
DERMATOMYOSITIS**

Kireev B.V.^{1,2,3}, Nikitich A.A.^{1,3}, Sokolov V.V.^{3,4}, Peskov K.V.^{1,3,4}, Volkova A.A.^{3,4}

¹*I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia,
Moscow, Russia*

²*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics,
Moscow, Russia*

³*G.I. Marchuk Institute of Computational Mathematics of the Russian Academy of
Sciences, Moscow, Russia*

⁴*SimurgFarm LLC, Moscow, Russia*

Дерматомиозит – хроническое аутоиммунное заболевание с характерными кожными проявлениями и поражениями мышечной ткани [1]. Среди зарегистрированных терапий на сегодняшний день нет ни одного таргетного препарата, что существенно снижает процент отвечающих на лечение пациентов [2]. Целью данной работы является построение математической модели иммунных процессов при дерматомиозите, которая позволит протестировать существующие и потенциальные таргетные лекарственные препараты и их

комбинации.

На основе биологических данных была воспроизведена схема патогенеза заболевания и составлена система обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ). Для калибровки модели был проведен систематический обзор количественных данных по уровням иммунных клеток и цитокинов в плазме крови человека, которые далее были агрегированы с использованием методологии мета-анализа с использованием библиотеки “metafor” в R (4.3.3). Часть параметров (скорости притока Т- и В-клеток, пролиферации Т- и В-клеток, времена полужизни цитокинов) была зафиксирована на литературных данных и соответствует физиологическим значениям. Оценка остальных параметров модели проводилась последовательно на *in vitro* данных в программном обеспечении Monolix (2021R1).

Разработанная модель включает в себя 10 ОДУ и описывает систему в состоянии стационарного равновесия для подгруппы пациентов без интерстициальной болезни легких. Отражены ключевые механизмы патогенеза дерматомиозита: динамика Т- и В-клеток, изменение уровней секретируемого иммуноглобулина G и креатинкиназы. Математическая модель корректно воспроизводит динамику креатинкиназы (КК) в ответ на изменение активности В-клеток и антител, что соответствует результатам клинических наблюдений. Модель показывает высокую чувствительность к действию IL-21 и CD40L (Рисунок 1), определяя их как потенциальные терапевтические мишени.

Разработана математическая модель, с помощью которой будут выполнены численные эксперименты выбора оптимальной мишени при лечении дерматомиозита.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 23-71-10051.

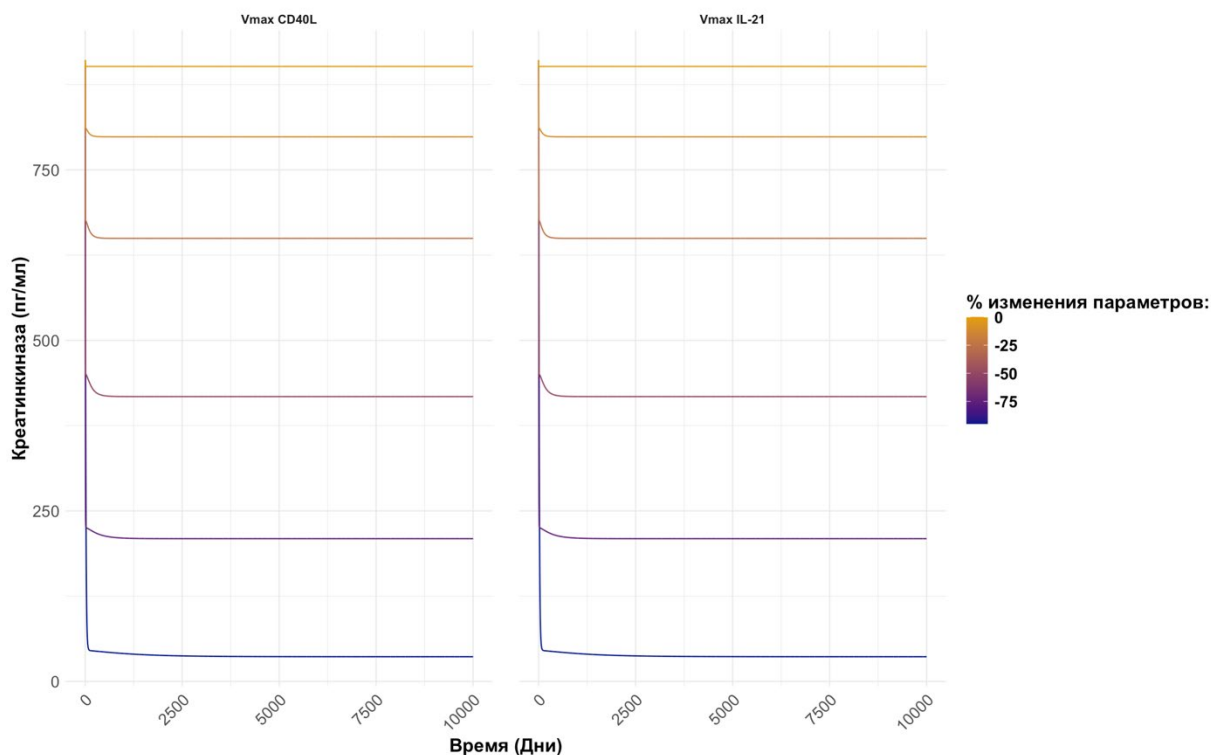


Рисунок 1 - Изменение стационарного уровня мышечного фермента креатинкиназы при варьировании параметров эффекта IL-21 и CD40L на активность В-клеточного иммунного ответа

Литература:

1. Krathen M. S., Fiorentino D., Werth V. P. Dermatomyositis //Current directions in autoimmunity. – 2008. – Т. 10. – С. 313.
2. Guo J. et al. Pharmacological Strategies in Dermatomyositis: Current Treatments and Future Directions //Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research. – 2024. – Т. 30. – С. e944564-1.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ
АНТИБИОТИКОВ КЛАССА СТРЕПТОГРАМИНОВ**

**Конева А.Л.^{1,2}, Полесскова Е.В.¹, Шуленина О.В.¹, Пичкур Е.Б.^{1,2}, Толстыко
Е.А.¹, Касацкий П.С.¹, Сергеев П.В.³**

¹*Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
Отделение молекулярной и радиационной биофизики*

²*Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Институт нано-, био-, информационных, когнитивных и социогуманитарных
наук и технологий*

³*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет
e-mail: konevega_al@pnpi.nrcki.ru*

**INVESTIGATION OF STREPTOGRAMIN ANTIBIOTICS MOLECULAR
MECHANISM OF ACTION**

**Konevega A.L.^{1,2} Paleskava A.¹, Shulenina O.V.¹, Pichkur E.B.^{1,2}, Tolstyko E.A.¹,
Kasatsky P.S.¹, Sergiev P.V.³**

¹*Petersburg Nuclear Physics Institute named by
B.P. Konstantinov of National Research Center “Kurchatov Institute”*

²*National Research Center “Kurchatov Institute”*

³*Lomonosov Moscow State University*

Определение молекулярного механизма действия антибиотиков преследует несколько целей. Во-первых, успешное решение подобных задач открывает возможность модификации существующих терапевтических препаратов для повышения их эффективности и преодоления бактериальной резистентности. Во-вторых, получаемая информация позволяет расширить наши знания о структуре и функциях мишеней конкретного препарата. В данной работе наше внимание было сосредоточено на представителях хорошо известного класса антибиотиков, стрептограминов. Стрептограмины используются в

терапевтической практике, главным образом, для лечения пациентов с серьёзными или опасными для жизни инфекциями кожи, мягких тканей [1, 2], костей и суставов [3], вызванными полирезистентными грамположительными патогенами [4], но детали их ингибирующего действия до сих пор остаются выясненными не до конца. Мы представляем результаты изучения молекулярного механизма действия представителей стрептограминов группы А на примере мадумидина II (Madu) и стрептограминов группы Б на примере этамицина А (EtaA).

В работе использовалась реконструированная бактериальная система *in vitro* трансляции из индивидуальных очищенных компонентов *E. coli* с флуоресцентными и радиоактивными метками для определения характеристик парциальных реакций цикла элонгации трансляции методами предстационарной кинетики (остановленного потока, погашенного потока), пептидного анализа, изучения термодинамических характеристик реакций, а также метода криогенной электронной микроскопии для определения структурных особенностей ингибирования.

Ранее было показано, что простейший представитель стрептограминов А, Madu, связывается непосредственно в пептидилтрансферазном центре (ПТЦ) бактериальной 70S рибосомы и эффективно ингибирует первый раунд элонгации, переводя ПТЦ в неактивное состояние [5]. Мы установили, что при связывании Madu повышает подвижность нуклеотидов ПТЦ, что не приводит к нарушению протекания реакции транспептидации *per se*. Более важным нам представляется тот факт, что антибиотик стерически взаимодействует с акцепторным концом тРНК в Р-сайте, вызывая его поворот на 180 градусов относительно своего нормального положения. Причём этот эффект наблюдается не только в случае деацилированной тРНК в Р-сайте, но также и тРНК, несущей один, два и даже три аминокислотных остатка. Также Madu аллостерически воздействует на доставляемую в А-сайт тРНК, нарушая её контакты с рибосомальной РНК, дестабилизируя тело тРНК и вызывая её преждевременную диссоциацию на этапе коррекции декодирования (пруффридинга). Смещённая

конформация акцепторного конца тРНК в Р-сайте и повышенная подвижность тРНК в А-сайте делают пептидилтрансферазную реакцию невозможной в присутствии Madu.

Представитель стрептограминов группы Б, EtaA, почти не изучен. Мы показали, что он располагается на некотором удалении от ПТЦ в выходном тоннеле 50S субчастицы и не влияет на первые раунды элонгации. EtaA ингибирует реакцию транспептидации в случае, когда пептид состоит из трёх остатков фенилаланина или валина, присоединенных к стартовому метионину. Этот эффект, скорее всего, обусловлен невозможностью беспрепятственного продвижения растущего пептида по выходному тоннелю рибосомы вследствие его частичной блокировки антибиотиком. Примечательно, что EtaA нарушает пептидилтрансферазную реакцию и в случае более короткого пептида, если в А-сайте располагается заряженная аминокислота, например, лизин, что указывает на контекстную специфичность действия EtaA. Структурное исследование подтвердило, что гидрофобные контакты между лейцином EtaA и остатками валинов растущего пептида приводят к реориентации последнего таким образом, что он направлен в сторону А-сайтовой тРНК. Гидрофобное окружение, образованное антибиотиком и растущим пептидом, приводит к отталкиванию заряженной аминокислоты в А-сайте и мешает её корректному позиционированию для осуществления пептидилтрансферазной реакции.

Таким образом, оба представителя группы стрептограминов, Madu и EtaA, обладают плеiotропным действием и эффективно нарушают биосинтез белка, ингибируя основную реакцию трансляции – транспептидацию.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема №1023031500033-1-

1.6.7;1.6.4;1.6.8 Функциональная и структурная организация сложных, мультикомпонентных биологических систем и их динамика).

Литература:

1. Haroche, J. et al. J. Clin. Microbiol. 2003. 41, 586–591.
2. Werner, G. et al. J. Clin. Microbiol. 2001. 39, 3586–3590.
3. Valour, F. et al. J. Antimicrob. Chemother. 2016. 71, 1063–1070.
4. Mast Y. et al. Int J Med Microbiol. 2014. 304, 44-50.
5. Osterman I.A. et al. Nucleic Acids Res. 2017. 45, 7507-7514.

**РАСТВОРИМЫЙ БЕЛОК sE ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА –
ПОМОЩНИК В ПОИСКЕ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

Красильникова А.А.^{1,2}, Додина М.С.¹, Козловская Л.И.^{1,2}

¹*Федеральный научный центр исследований и разработки*

иммунобиологических

*препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), лаборатория
полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с референс-центром ВОЗ по
надзору за полиомиелитом*

²*Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.*

Сеченова

Минздрава России (Сеченовский университет), кафедра организации и

технологии производства иммунобиологических препаратов

email: kras2048@gmail.com

**SOLUBLE sE PROTEIN OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS
HELPS SEARCHING FOR ANTIVIRAL COMPOUNDS**

Krasilnikova A.A.^{1,2}, Dodina M.S.¹, Kozlovskaya L.I.^{1,2}

¹*Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-
Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis)*

²*I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of
the Russian Federation (Sechenov University)*

Большая часть территории РФ является эндемичной по клещевому

энцефалиту (КЭ). Тяжёлые последствия заболевания, низкий охват вакцинацией и её высокая стоимость делают актуальной разработку специфических препаратов для экстренной профилактики и лечения. Один из подходов к разработке – это создание препаратов, ингибирующих связывание вириона с поверхностными рецепторами или его проникновение в клетку. Данные стадии репликативного цикла вируса определяются поверхностным белком вириона Е. Мишень-направленный поиск таких препаратов требует значительного количества рекомбинантного белка Е. Однако получение растворимой формы этого белка затруднено его склонностью к агрегации и деградации вследствие неправильного фолдинга во время экспрессии.

Целью нашей работы была разработка метода получения растворимого эктодомена белка Е (sE) в клетках *E. coli*, избегая этап рефолдинга, и оценка возможности его использования для мишень-направленного скрининга.

Ген, кодирующий белок sE, был клонирован в вектор pET-28. Белок экспрессировали совместно с шаперонами (Chaperone Plasmid Set, Takara Bio) для преодоления проблемы деградации белка, обеспечения правильного фолдинга и растворимости белка.

После оптимизации экспрессии и очистки, функциональная активность белка sE была подтверждена методом иммуноферментного анализа с использованием сывороток крови мышей и людей, иммунизированных вакциной от клещевого энцефалита. Также способность белка взаимодействовать с ингибиторами показали методом спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса с химерным моноклональным антителом 14D5 и двумя низкомолекулярными ингибиторами репродукции вируса КЭ *in vitro*.

Таким образом, нами разработан метод получения растворимого белка sE вируса КЭ в бактериальной системе экспрессии без стадии рефолдинга, который может быть использован для мишень-направленного поиска селективных ингибиторов.

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЕЙ ШТАММОВ РОДА *HERICIUM*

Лысакова В.С., Синева О.Н., Исакова Е.Б., Краснопольская Л.М.

ФГБНУ "Научно-исследовательский институт по изысканию новых

антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе"

e-mail: valera.lisackowa@yandex.ru

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CULTURE LIQUID EXTRACTS OF OF THE GENUS *HERICIUM* STRAINS

Lysakova V.S., Sineva O.N., Isakova E.B., Krasnopol'skaya L.M.

Gause Institute of New Antibiotics

Ежовик коралловидный *Hericium coralloides* и ежовик гребенчатый *Hericium erinaceus* – редкие съедобные ксилотрофы, Базидиомицеты рода *Hericium* являются источником пищевых добавок, лекарственных молекул, способных стимулировать экспрессию факторов роста нервов [1,2]. Однако, их антимикробные свойства изучены значительно меньше.

Цель нашей работы заключалась в оценке антимикробных свойств штаммов видов *Hericium coralloides* и *Hericium erinaceus* для выбора штамма-лидера. Главными методами в этой работе являлись: погруженное культивирование базидиомицетов на жидкой среде, определение антимикробной активности методом диффузии из лунок в агар, определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) микрометодом серийных разведений.

Всего было изучено 8 штаммов: *H. coralloides* 1, *H. coralloides* 4, *H. coralloides* 18, *H. coralloides* 5, *H. erinaceus* 1, *H. erinaceus* 9, *H. erinaceus* 12, *H. erinaceus* 17. Каждый штамм был выращен в погруженной культуре, определены сроки накопления максимальной сухой биомассы (6-7 суток на ферментационной среде). После этого были получены экстракты культуральных жидкостей и погруженных биомасс.

На первом этапе антимикробное действие экстрактов определяли методом диффузии из лунок в агар. Активностью обладали 6 из 8 экстрактов

культуральных жидкостей, из экстрактов погруженной биомассы был активен только образец *H. coralloides* 4 (таблица 1).

Таблица 1 - Антимикробная активность экстрактов культуральных жидкостей штаммов рода *Hericium*.

Штамм	Антимикробная активность (зоны подавления роста, мм)				
	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A.niger</i>
<i>Hericium coralloides</i> 1	24	20	н/а	н/а	11
<i>Hericium coralloides</i> 4	26	24	12	н/а	15
<i>Hericium coralloides</i> 18	23	17	13	н/а	н/а
<i>Hericium coralloides</i> 5	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а
<i>Hericium erinaceus</i> 1	20	13	н/а	н/а	н/а
<i>Hericium erinaceus</i> 9	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а
<i>Hericium erinaceus</i> 12	17	15	н/а	н/а	н/а
<i>Hericium erinaceus</i> 17	20	12	н/а	н/а	10

Экстракт биомассы *H. coralloides* 4 был активен в отношении грамположительных бактерий (20+ мм) и в отношении *Aspergillus niger* (12+мм). Для активных экстрактов штаммов были определены МПК. Для экстракта культуральной жидкости *H. coralloides* 4, МПК в отношении *Staphylococcus aureus* составило 80 мкг/мл, *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* – 160 мкг/мл. Подобные результаты другие экстракты не показали. Таким образом именно этот штамм был выбран в качестве продуцента лидера.

Для *H. coralloides* 4 были подобраны источники питания для погруженного культивирования этого штамма, высокая антимикробная активность экстрактов обеспечивалась использованием сочетания глюкозы в качестве источника углерода и дрожжевого экстракта – источника азота. Активность возросла в

отношении грамположительных бактерий (30+ мм). Была подобрана схема экстракции, заключающаяся в последовательном использовании хлороформа и этилацетата, таким образом оба экстракта показывают высокую антимикробную активность, несмотря на их различную полярности. Это может свидетельствовать о том, что в своем составе экстракты *H. coralloides* 4 содержат несколько антимикробных метаболитов различной химической природы. Фракционирование и идентификация будут проведены в будущих исследованиях.

Таким образом из 8 штаммов был выбран штамм-лидер: *H. coralloides* 4, для которого была показана высокая антимикробная активность. Этот штамм будет в дальнейшем изучен с помощью медикобиологических и физико-химических методов.

Литература

1. Wittstein K. et al. Coralloins A–C, nerve growth and brain-derived neurotrophic factor inducing metabolites from the mushroom *Herichium coralloides* // Journal of natural products. 2016. V. 79 (9). P. 2264-2269.
2. Thongbai, B., Rapior, S., Hyde, K. D., Wittstein, K., Stadler, M. *Herichium erinaceus*, an amazing medicinal mushroom. // Mycological Progress. 2015.V. 14(10). P. 91.

ВЛИЯНИЕ ТЕТРАПЕПТИДОВ НА ПРОЦЕССЫ УЛЬТРАКРАТКОСРОЧНОЙ ГАБИТУАЦИИ У КРЫС WISTAR, ПОДВЕРГШИХСЯ ПРИНУДИТЕЛЬНОМУ ПЛАВАНИЮ

***Макеева Д.И.^{1,2}, Саванец О.Н.², Кравченко Е.В.², Бородина К. В.²,
Грибовская О. В.², Зильберман Р.Д.², Бизунок Н.А.¹, Дубовик Б.В.¹***

¹*Белорусский государственный медицинский университет, кафедра
фармакологии*

²*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, лаборатория токсикологии
e-mail: D.MakeevaRA@gmail.com*

THE EFFECT OF TETRAPEPTIDES ON THE PROCESSES OF SHORT-TERM HABITUATION IN WISTAR RATS SUBJECTED TO FORCED SWIMMING

Makeeva D.I.^{1,2}, *Savanets O.N.*², *Kravchenko E.V.*², *Borodina K. V.*²,

*Gribovskaya O. V.*², *Zilberman R.D.*², *Bizunok N.A.*¹, *Dubovik B.V.*¹

¹*Belarusian State Medical University*

²*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus*

Цель: скрининговое изучение ноотропной активности пяти тетрапептидов в экспериментах на крысах Wistar после воздействия неизбежного стресса в тесте ультракраткосрочной габитуации в актометре.

Актуальность. Эффективное реагирование на чрезвычайные ситуации требует быстрой оценки обстановки и принятия адекватных решений. У большинства людей в первые минуты форс-мажора может наблюдаться снижение когнитивных функций и двигательной активности. У животных в условиях «острого» стресса в первые минуты возможно снижение исследовательско-ориентировочной активности, связанное с «freezing»-реакцией [1,2,3]. Биологически активные пептиды являются потенциальными лекарственными препаратами для снижения тревожности и улучшения когнитивных функций с коротким началом действия [3].

Методы: Эксперименты проводили на аутбредных половозрелых крысах-самцах Wistar (n=180). Стрессирование животных осуществляли в условиях принудительного плавания (ПП) по методу Porsolt. Затем в многоканальном актометре в условиях тестирования животных поодиночке оценивали уровень вертикальной двигательной активности (ВДА) за 5 мин; определяли отношение числа вертикализаций в 5-ю мин к 1-й мин ($K_{y_{\text{таш}}}$). N-Ac-LSer-LPro-LArg-Gly-NH₂ (B-1), N-Ac-DSer-LPro-LArg-Gly-NH₂ (B-2), N-Ac-LPhe-LPro-LArg-Gly-NH₂ (B-3), N-Ac-DSer-LPro-DArg-Gly-NH₂ (B-4), N-Ac-LTrp-LPro-LArg-Gly-NH₂ (B-5) синтезированы в лаборатории прикладной биохимии Института биоорганической химии НАН Беларуси (К. В. Бородина, О.В. Грибовская и др.).

Растворитель (Р) и тетрапептиды (0,1; 1,0 и 10,0 мкг/кг) вводили грызунам интраназально.

Результаты: в группе интактного контроля (К-1) в 1 мин актометрии значения ВДА составили 110 ± 56 усл.ед., в 5 - 75 ± 50 усл.ед. ($K_{\text{угаш.}}$ – 68%). У крыс, подвергшихся FST (К-2), соответствующие показатели составили 82 ± 53 усл.ед. и 83 ± 49 усл.ед. ($K_{\text{угаш.}}$ – 102%). При введении В-1, В-2 статистически значимого облегчения неассоциативного обучения не выявлено. Выраженная габитуация отмечена на фоне В-5 (1,0 мкг/кг) - $K_{\text{угаш.}}$ – 56%; $p < 0.020$. Тенденция к повышению $K_{\text{угаш.}}$ отмечена при введении В-2 (1,0 мкг/кг) и В-4 (0,1 мкг/кг). Выраженное усиление габитуации отмечено на фоне В-5 (1,0 мкг/кг) - $K_{\text{угаш.}}$ – 56%; $p < 0.020$ (Рис. 1).

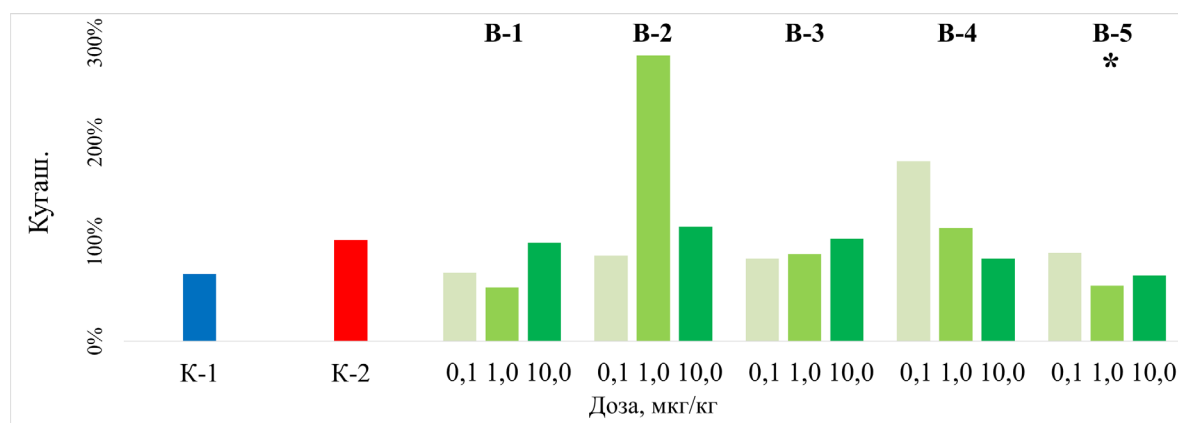


Рисунок 1 - Влияние тетрапептидов (В-1 – В-5) на коэффициент угашения числа вертикализаций в 5-ю мин к 1-й мин (интактный контроль - К-1, стрессированный - К-2)

Выводы: Наиболее перспективное исследование для разработки – В-5 в дозе 1,0 мкг/кг, препятствующее дезорганизующему влиянию стресса на габитуацию в пятиминутный срок.

Литература:

1. Prut L. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review / L. Prut, C. Belzung // European Journal of

Pharmacology. – 2003. – Vol. 463, Issue 1-3. – P. 3-33.

2. Тревожные расстройства в клинической практике (обзор литературы с клинической иллюстрацией) / Д. С. Петелин [и др.] // Медицинский совет. – 2024. – Т. 18, № 12. – С. 52–60.

3. Hu H. Arginine vasopressin in mood disorders: A potential biomarker of disease pathology and a target for pharmacologic intervention / H. Hu, C.A. Zarate, J. Verbalis // Psychiatry Clin Neurosci. – 2024. Vol. 78, Issue 9. – P. 495-506.

БЕЛКИ ЕРАС – ПЕРСПЕКТИВНАЯ БИОМИШЕНЬ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ОРИГИНАЛЬНЫХ КАРДИОПРОТЕКТОРОВ

**Мокров Г.В., Воробьева Т.Ю., Столярук В.Н., Крыжановский С.А.,
Дорофеев В.Л.**

*ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий»*

e-mail: mokrov_gv@academpharm.ru

ERAC PROTEINS ARE A PROMISING BIOTARGET FOR THE CREATION OF ORIGINAL CARDIOPROTECTORS

Mokrov G.V., Vorob'eva T.Yu., Stolyaruk V.N., Kryzhanovsky S.A., Dorofeev V.L.

*"Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and
Pharmaceutical Technologies"*

К настоящему времени накоплен убедительный материал о вкладе белков Ерас в формирование таких патологических процессов как гипертрофия, ремоделирование, фиброз миокарда и нарушение сердечного ритма, что создает фундаментальную базу для поиска оригинальных лекарственных средств на основе блокаторов белков Ерас [1]. Такой подход позволит обеспечить новые терапевтические направления для лечения патологий миокарда и снижения риска внезапной сердечной смерти.

С использованием методов молекулярного моделирования была

сконструирована группа бензоильных и арилсульфонильных производных аминопиридинов в качестве потенциальных ингибиторов белков Ерас (рисунок 1). В *in silico* исследованиях установлено, что новые соединения стабилизируют белки Ерас в их неактивном состоянии. Синтез веществ проводился на основе аминопиридинов, бензоилхлоридов и арилсульфонилхлоридов. Установлено, что полученные соединения подавляют силу сокращений и автоматизм изолированных полосок миокарда. Предварительно отобрано соединение-лидер ZMEI-3, которое обладает антиаритмической активностью в модели реперфузионных аритмий и способствует увеличению сократимости левого желудочка сердца в условиях алкогольной кардиомиопатии.

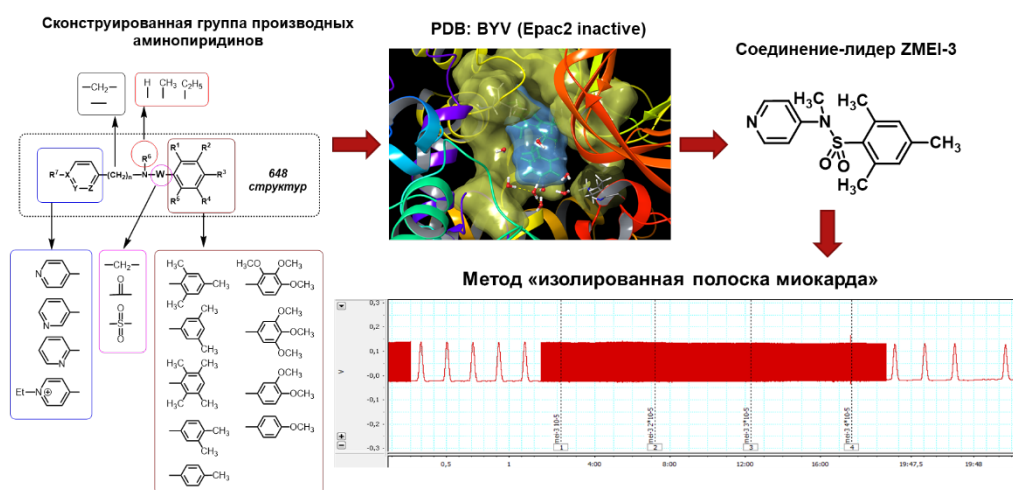


Рисунок 1 - Подход к созданию потенциальных ингибиторов белков Ерас

В ходе исследований было установлено, что сконструированная группа потенциальных ингибиторов белков Ерас ряда производных аминопиридинов обладала кардиопротекторными свойствами, что открывает перспективу создания средств для лечения сердечно-сосудистых заболеваний нового поколения.

Литература:

1. Мокров Г.В., Никифорова Т.Д., Крыжановский С.А. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2019. Вып. 4. С. 3–17.

**ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКА ENTPD1 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ МИШЕНИ
ТЕРАПИИ ГЛАУКОМЫ НОРМАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ МЕТОДОМ
МЕНДЕЛЕВСКОЙ РАНДОМИЗАЦИИ**

Плотников Д.Ю.

*ФГБОУ ВО Казанский Государственный Медицинский Университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Центральная Научно-
исследовательская лаборатория
e-mail: denis.plotnikov@kazangmu.ru*

**IDENTIFICATION OF ENTPD1 PROTEIN AS A POTENTIAL
THERAPEUTIC TARGET FOR NORMAL TENSION GLAUCOMA USING
MENDELIAN RANDOMIZATION**

Plotnikov D. Yu.

*Kazan State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation,
Kazan, Russia*

Актуальность. Глаукома нормального давления (ГНД) является преобладающей формой первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ) в ряде регионов, особенно в Восточной Азии, где на ее долю приходится до 60% случаев [1]. Стандартная терапия, направленная на снижение внутриглазного давления (ВГД), часто оказывается недостаточно эффективной у пациентов с ГНД [2, 3], что обуславливает необходимость поиска новых мишеней для нейропротективной терапии, нацеленной на механизмы гибели ганглиозных клеток сетчатки, независимые от ВГД [4].

Цель исследования. С использованием метода менделевской рандомизации (МР) идентифицировать белки плазмы крови, причинно связанные с риском развития ГНД через механизмы, не зависящие от уровня ВГД.

Материалы и методы. Проведен двухвыборочный анализ МР. В качестве воздействия использовались генетические инструменты (*cis*-pQTL) для уровней

белков плазмы, полученные из исследования ARIC [5]. Для исхода применялись сводные статистики GWAS для ПОУГ, обработанные методом «GWAS-by-subtraction» для выделения генетического компонента, независимого от ВГД [6]. Анализ выполнялся с применением метода взвешенной обратной дисперсии. Для проверки на плеiotропию и гетерогенность использовались MR-Egger тест и тест Кохрана. Значимые ассоциации проверялись с помощью анализа колокализации.

Результаты. После коррекции на множественные сравнения ($p < 3,46 \times 10^{-5}$) выявлены два белка, значимо ассоциированных с риском ГНД-компонента ПОУГ: AIDA (положительная ассоциация, $\beta=0.45$, $p=3,45 \times 10^{-5}$) и ENTPD1 (отрицательная ассоциация, $\beta=-0.36$, $p=2.61 \times 10^{-5}$, $OR=0.69$). Анализ колокализации подтвердил наличие общего причинного генетического варианта для локуса ENTPD1 и риска глаукомы (постериорная вероятность $>70\%$). ENTPD1 является ключевым ферментом пуриnergической сигнализации, катализирующим гидролиз внеклеточного АТФ, избыток которого приводит к нейротоксичности через активацию P2X7-рецепторов.

Выводы. Метод Менделевской рандомизации позволил идентифицировать белок ENTPD1 в качестве потенциального защитного фактора при ГНД. Полученные данные обосновывают перспективность разработки терапевтических стратегий, направленных на усиление активности ENTPD1 для нейропротекции при глаукоме нормального давления, что особенно актуально для пациентов, не отвечающих на стандартную терапию снижения ВГД.

Работа выполнена за счет гранта № 135/2024 Академии наук Республики Татарстан, предоставленного молодым кандидатам наук (постдокторантам) с целью защиты докторской диссертации, выполнения научно-исследовательских работ, а также выполнения трудовых функций в научных и образовательных организациях Республики Татарстан в рамках Государственной программы Республики Татарстан «Научно-технологическое развитие Республики Татарстан».

Литература

1. Shiose Y, Kitazawa Y, Tsukahara S, Akamatsu T, Mizokami K, Futa R, et al. Epidemiology of glaucoma in Japan--a nationwide glaucoma survey. Jpn J Ophthalmol. 1991;35(2):133-55.
2. Noecker RS, Dirks MS, Choplin NT, Bernstein P, Batoosingh AL, Whitcup SM. A six-month randomized clinical trial comparing the intraocular pressure-lowering efficacy of bimatoprost and latanoprost in patients with ocular hypertension or glaucoma. American Journal of Ophthalmology. 2003;135(1):55-63.
3. Scherer WJ. A Retrospective Review of Non-Responders to Latanoprost. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. 2002;18(3):287-91.
4. Rolle T, Ponzetto A, Malinverni L. The Role of Neuroinflammation in Glaucoma: An Update on Molecular Mechanisms and New Therapeutic Options. Frontiers in Neurology. 2021;11.
5. Zhang J, Dutta D, Köttgen A, Tin A, Schlosser P, Grams ME, et al. Plasma proteome analyses in individuals of European and African ancestry identify cis-pQTLs and models for proteome-wide association studies. Nature Genetics. 2022;54(5):593-602.
6. Huang Y, Plotnikov D, Wang H, Shi D, Li C, Zhang X, et al. GWAS-by-subtraction reveals an IOP-independent component of primary open angle glaucoma. Nature Communications. 2024;15(1):8962.

ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫЕ СИНОВИОЦИТЫ, КАК ОСНОВА *IN VITRO* МОДЕЛИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ АНТИЦИТОКИНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Риппинен Д.В., Соловьева А.О.

*Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной
лимфологии – филиал ИЦиГ СО РАН, лаборатория фармакологических
активных соединений
e-mail: d@rippinen.ru*

FIBROBLAST-LIKE SYNOVIOCYTES AS THE BASIS OF AN *IN VITRO* MODEL OF RHEUMATOID ARTHRITIS FOR TESTING ANTI-CYTOKINE DRUGS

Rippinen D.V., Solovieva A.O.

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology

Ревматоидный артрит (РА) — это стойкое воспалительное системное аутоиммунное заболевание, характеризующееся артритом и системным поражением внутренних органов, приводящей к инвалидизации и ухудшению качества жизни пациентов.[1]. Ключевую роль в патогенезе РА играют фибробластоподобные синовиоциты (ФПС), которые в активированном состоянии приобретают агрессивный фенотип: высокая пролиферативная и миграционная способность, секреция провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ФНО- α) и ферментов, разрушающих хрящ и субхондриальную кость (ММП) [2]. В связи с этим ФПС представляют собой перспективную клеточную модель для доклинического скрининга антицитокиновых препаратов. Однако сохранение патогенного фенотипа ФПС в условиях *in vitro* требует тщательной характеристики и стандартизации условий культивирования.

Была создана коллекция из 22 первичных линий ФПС, выделенных от пациентов с ревматоидным артритом различной степени активности из синовиальной оболочки (n=14) и синовиальной жидкости (n=8). Для моделирования воспалительного состояния применялся ФНО- α , как основной медиатор воспаления в патогенезе РА. Основными молекулами скрининга являлись матриксная металлопротеиназа-13 (ММП-13) и интерлейкин-6 (ИЛ-6). В качестве контроля использовались дермальные фибробласты.

ФПС обладали веретеновидной формой и характерными маркерами мезенхимальных клеток: CD90⁺, CD73⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD34⁻. Культивирование ФПС в воспалительной среде приводило к морфологическим изменениям, которые проявлялись в приобретении черт миофибробластов, что возможно ассоциировано с преждевременным клеточным старением. Воспаление

приводило к усилению секреции ММП-13 и ММП-14 в сравнении с стандартными условиями и дермальными фибробластами (рис.1), увеличению пролиферативной и миграционной активности, которая коррелировала с активностью заболевания донора.

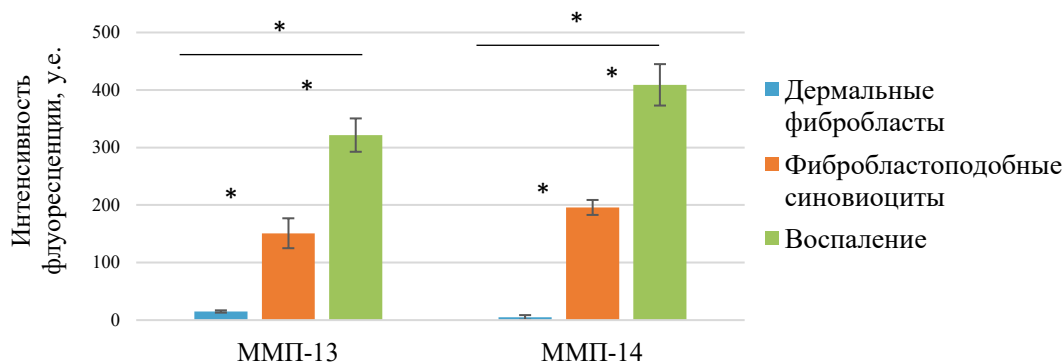


Рисунок 1 - Экспрессия ММП-13 фибробластоподобными синовиоцитами. *
- $p < 0,05$

Пролиферативный потенциал и миграция не снижались до 7 пассажа, тогда как базовая секреция ИЛ-6 значительно снижалась после 5–6 пассажей. Была выявлена гетерогенность линий по секреции ИЛ-6: высокосекретирующие ($1914 \pm 671,6$ пг/мл), со средней секрецией ($367,5 \pm 56,0$ пг/мл) и низкосекретирующие ($12,0 \pm 2,2$ пг/мл). Линии со средней секрецией проявляли наибольшую чувствительность к стимуляции ФНО- α , тогда как остальные группы имели незначительную реакцию на воспалительные факторы (рис.2).

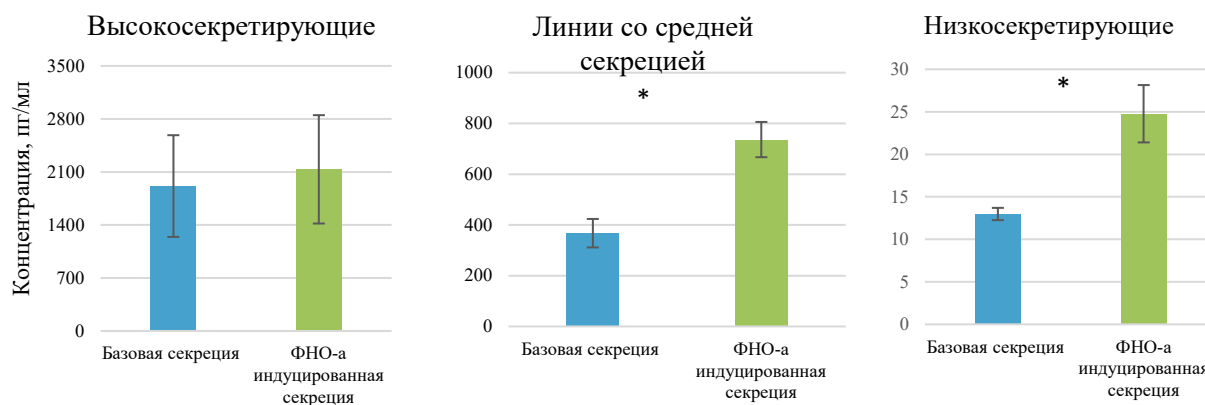


Рисунок 2 - Секреция ИЛ-6 и чувствительность к ФНО- α ФПС. * - $p < 0,05$

Созданная и охарактеризованная в работе коллекция первичных клеточных линий продемонстрировала выраженную функциональную гетерогенность, отражающую клиническое разнообразие доноров, что является важным критерием для моделирования сложного патогенеза РА. Было установлено, что ключевые патогенные характеристики ФПС, такие как устойчивость к апоптозу, высокая миграционная и пролиферативная активность, сохраняются в культуре на протяжении нескольких пассажей. Однако, секреторный профиль ФПС, в частности уровень базовой и индуцированной секреции ИЛ-6, показал зависимость от числа пассажей, значительно снижаясь к 5–6. Это наблюдение подчеркивает необходимость тщательного отбора и стандартизации клеточных линий — для скрининговых исследований наиболее пригодны линии 3–5 пассажа, сочетающие сохраненный патологический фенотип с чувствительностью к провоспалительным стимулам, таким как фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α).

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки

РФ (госзадание FWNR-2025-0016).

Литература:

1. Firestein G., McInnes I.B. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis.
2. Modak D., Bhattacharjee S. A review of fibroblast-like synoviocytes in the pathogenesis of Rheumatoid arthritis: Their activation and the inhibition of their apoptosis // Biomedical Research and Therapy. BiomedPress, 2022.

ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ ФРАГМЕНТА АРГИНИН-ВАЗОПРЕССИНА НА ПОВЕДЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ГРЫЗУНОВ

Саванец О.Н., Кравченко Е.В., Ольгомец Л.М., Бородина К.В.

ГНУ «Институт биоорганической химии Национальной академии наук

Беларуси», лаборатория токсикологии

e-mail: savanets@iboch.by

EFFECT OF MODIFIED ANALOGUES OF THE ARGININE-VASOPRESSIN FRAGMENT ON THE BEHAVIOR OF LABORATORY RODENTS

Savanets O.N., Olgomets L.M., Borodina K.V.

*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of
Belarus*

Цель. Изучение поведенческих эффектов пролинсодержащих тетрапептидов и индивидуальной чувствительности к ним в опытах на лабораторных грызунах.

Актуальность. Приоритетным направлением современной психофармакологии является создание высокоактивных соединений с безопасным профилем действия, одними из которых являются синтетические аналоги эндогенных соединений [1].

Методы. В психофармакологических экспериментах на мышах и крысах (469 особей) проведен анализ активности олигопептидов N-Ac-Ser-Pro-Arg-Gly-NH₂, N-Ac-DSer-Pro-Arg-Gly-NH₂, N-Ac-Phe-Pro-Arg-Gly-NH₂, N-Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH₂, N-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ (0,1; 1,0 и 10,0 мкг/кг), N-Ac-Tyr-Pro-Arg-Gly-NH₂ (1,0 мкг/кг) – интраназально и Pro-Gly (0,5 мг/кг) – интрагастрально в сравнении с флуоксетином и мелатонином (внутрибрюшинно). В тестах принудительное плавание (ПП) по Porsolt, оперантное поведение, актометрия/частота выхода в центр актометра проведена скрининговая оценка эффективности образцов.

Отобранные соединения изучены в опытах на 103 крысах Wistar. На протяжении часа после ПП на фоне введения N-Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH₂ (B-4), N-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ (B-5) и флуоксетина регистрировали вертикальную (ВДА) двигательную активность в актометре. Животных с высоким числом короткопериодных эпизодов активного плавания (N) считали склонными к дезадаптации [2].

Результаты. Наиболее выраженная антидепрессантоподобная активность

(достоверное снижение длительности иммобилизации и тенденция к повышению активного плавания), сочетающаяся с хронотропным действием (устранение коротких «патологических» ритмов, являющихся маркером десинхроноза, возникающего на фоне стресса) выявлена у N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH₂ и N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂. Эффекты были сопоставимы с таковыми у антидепрессанта флуоксетина и эпифизарного гормона мелатонина.

N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ (В-5, 1,0 мкг/кг) обладал анксиолитическим действием (повышал долю животных (**D**, %), пребывавших в центральном квадрате $\geq 10\%$ от времени нахождения в камере актометра в сравнении с исходным уровнем до стресса, $p < 0,05$, точный критерий Фишера, рисунок 1).

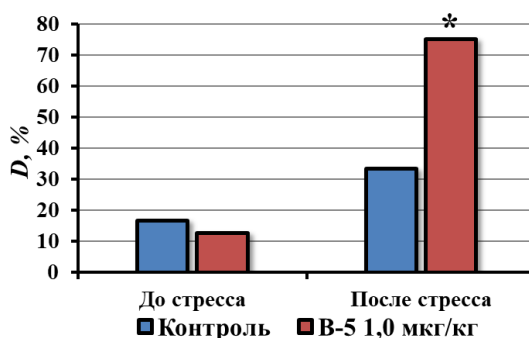
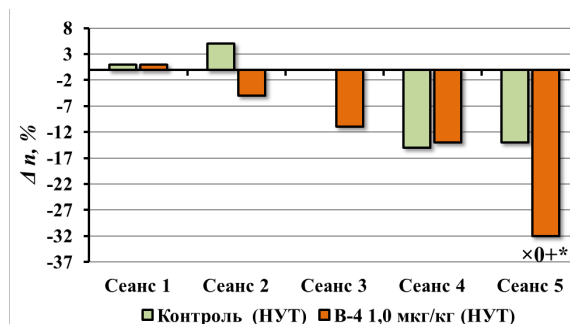


Рисунок 1 - Влияние N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ (В-5, 1,0 мкг/кг, и/н) на частоту посещения крысами центрального квадрата актометра за 60 мин актометрии

N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH₂ (В-4, 1,0 мкг/кг) характеризовался ноотропным действием (усиливал способность к обучению (**Δ n**, %) в оперантных камерах у животных с исходно низким уровнем тревожности (НУТ)), а также вызывал менее выраженное ослабление мнестических функций по показателю «снижение числа ударов током» относительно исходного уровня (рисунок 2).

В дозе 1,0 мкг/кг N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ оказывал избирательное воздействие (тенденция к снижению исследовательско-ориентировочной реакции, т.е. числа вертикализаций – **ВДА**) у крыс со средним уровнем числа

короткопериодных эпизодов активного плавания – N (средний уровень устойчивости к стрессу в тесте принудительного плавания), а флуоксетин в дозе 20,0 мг/кг – на крыс с высоким (слабый уровень устойчивости к стрессу) – рисунок 3.



$p < 0,05$, критерий Фридмана с последующей обработкой данных методом апостериорных сравнений по критерию Ньюмена-Кейлса; 0 – то же, в сравнении с сеансом 2; + – то же, в сравнении с сеансом 3, * – то же, в сравнении с сеансом 4

Рисунок 2 - Влияние N-Ас-DСер-Pro-DArg-Gly-NH₂ (В-4, 1,0 мкг/кг, и/н) на динамику снижения числа пропущенных ударов током у крыс с низким уровнем тревожности

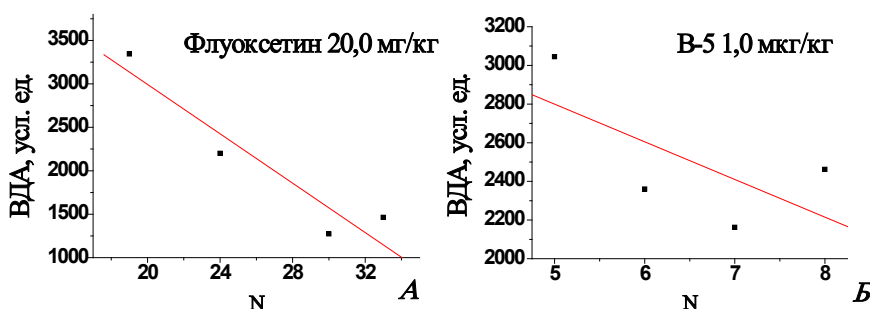


Рисунок 3 - Влияние флуоксетина (20,0 мг/кг, в/б) и N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ (В-5, 1,0 мкг/кг, и/н) на уровень исследовательско-ориентировочной реакции (ВДА) крыс в зависимости от степени устойчивости к стрессу (N)

Выводы. В результате психофармакологического скрининга выявлены высокоактивные пептиды N-Ас-DСер-Pro-DArg-Gly-NH₂ и N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂. Предположительно, N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH₂ будет эффективен у

Литература.

1. Абдуллина А.А., Васильева Е.В., Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Ковалёв Г.И. Влияние циклопролилглицина и его аналогов на моноаминергические системы мозга мышей BALB/c. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2020. № 1. С. 3–10.

2. Ованесов К.Б., Бейер Э.В., Каминская О.В., Эльбекьян К.С., Скорняков А.А., Алексанова Е.М. Хронофармакологические аспекты антистрессорного действия анксиолитических средств. Психофармакология и биологическая наркологи́я. 2023. Т.14, № 1. С. 40–48.

ЦИАНОКОБАЛАМИН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК ТЕРМОФИЛЬНОГО МИКРООРГАНИЗМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ БИОСЕНСОРОВ ВИТАМИНА В₁₂

Симоненко С.Ю., Кульдюшев Н.А.

*АНОО ВО Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр
трансляционной медицины
e-mail: Simonenko.SY@talantiuspeh.ru*

CYANOCOBALAMIN-BINDING PROTEIN FROM A THERMOPHILIC MICROORGANISM FOR CREATING GENETICALLY ENCODED VITAMIN В₁₂ BIOSENSORS

Simonenko S.Y., Kuldyushev N.A.

Sirius University of Science and Technology

Цель работы: поиск и характеристика цианокобаламин-связывающего белка термофильного микроорганизма *Fervidobacterium riparium*.

Актуальность: у человека даже при физиологически нормальной концентрации витамина В₁₂ (кобаламина) в крови может возникать его дефицит

в клетках [1]. Это ведёт к снижению активности B_{12} -зависимой метионинсинтазы и дефициту универсального донора метильных групп в клетке – SAM. В результате нарушаются процессы метилирования ДНК и гистонов – основные механизмы клеточной эпигенетической регуляции [2, 3], дестабилизируется генетический материал клеток, что приводит к наступлению в них сенесенса и повышению риска канцерогенеза в их микроокружении [4, 5]. Впервые охарактеризованный нами белок из *F. riparium* позволит создать на его основе генетически кодируемый биосенсор для неинвазивного измерения концентраций B_{12} в клетках, что на сегодняшний день невозможно [6], но необходимо для повышения эффективности сенесенс-зависимых стратегий лечения опухолевых заболеваний.

Методы: выделение геномной ДНК; клонирование гена интереса с помощью ПЦР, рестрикции и лигирования в экспрессионный плазмидный вектор; контролируемая гетерологическая экспрессия; ультразвуковой лизис; центрифугирование; металл-хелатная хроматография; вертикальный электрофорез в ПААГ; ультрафильтрация; спектрофотометрия; дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК).

Результаты: ген интереса из *F. riparium* был клонирован из геномной ДНК в экспрессионный вектор рЕТ30а, была проведена контролируемая экспрессия в *E. coli* BL21 (DE3). Клетки были лизированы ультразвуком, белок был выделен из лизата металл-хелатной хроматографией и обессолен, после чего двумя ортогональными методами было подтверждено его связывание с витамином B_{12} (рис. 1).

В ходе работы использовалась фармацевтическая форма витамина B_{12} – цианокобаламин. Его спектр поглощения специфически изменялся при инкубации с белком FR: возрастали амплитуды полос при 360, 410, 510 и 550 нм (рис. 2а), что соответствует изменениям, возникающим при инкубации цианокобаламина с уже известными B_{12} -связывающими белками [7-9]. Методом ДСК было установлено, что FR высоко термостабилен, а температура его плавления повышается в присутствии витамина B_{12} как в буфере с pH 3,5 – на

6°C (рис. 2б), так и в буфере с pH 7,8 – на 3°C (рис. 2в), что подтверждает высокоспецифичное связывание FR с B₁₂ в комплекс [10].

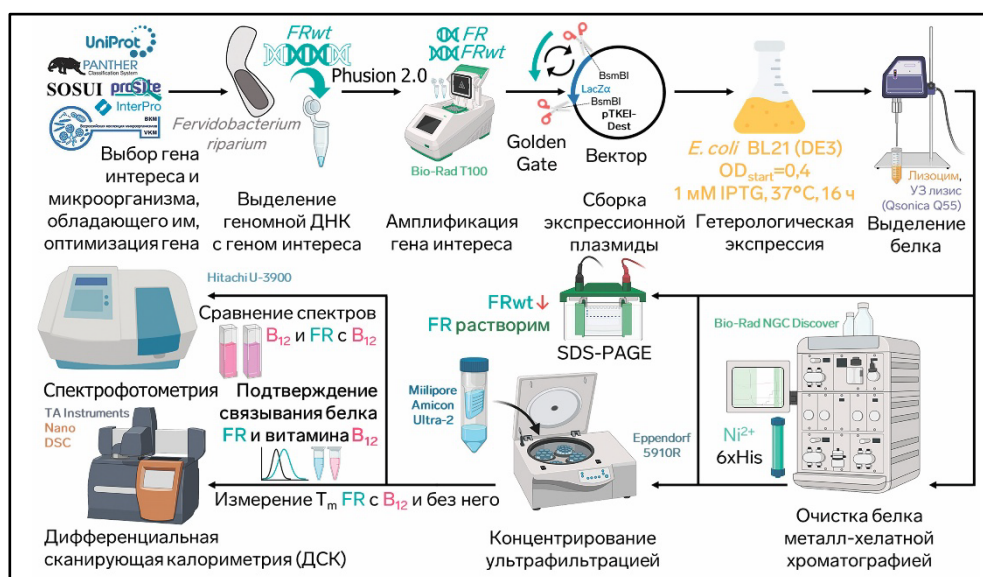


Рисунок 1 - Методологическая схема работы

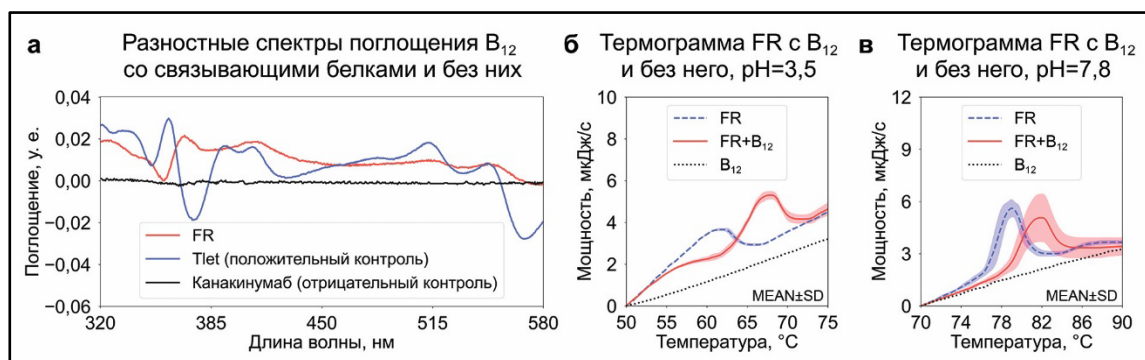


Рисунок 2 - Эффекты высокоспецифичного связывания цианокобаламина с белком FR

Выводы: охарактеризован новый цианокобаламин-связывающий белок из термофильного микроорганизма *F. riparium*. Двумя ортогональными методами подтверждена его способность связывать цианокобаламин, подтверждена высокая термостабильность, что делает возможным его использование в качестве сенсорного домена генетически кодируемого биосенсора витамина B₁₂.

Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда № 23-75-01141, <https://rscf.ru/project/23-75-01141/>

Литература:

1. Zhang Y. et al. Decreased brain levels of vitamin B₁₂ in aging, autism and schizophrenia //PloS one. – 2016. – Т. 11. – №. 1. – С. e0146797.
2. Froese D. S., Fowler B., Baumgartner M. R. Vitamin B₁₂, folate, and the methionine remethylation cycle—biochemistry, pathways, and regulation //Journal of inherited metabolic disease. – 2019. – Т. 42. – №. 4. – С. 673-685.
3. Halczuk K. et al. Vitamin B₁₂—Multifaceted *in vivo* functions and *in vitro* applications //Nutrients. – 2023. – Т. 15. – №. 12. – С. 2734.
4. Li F. et al. Blocking methionine catabolism induces senescence and confers vulnerability to GSK3 inhibition in liver cancer //Nature cancer. – 2024. – Т. 5. – №. 1. – С. 131-146.
5. Ruhland M. K. et al. Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis //Nature communications. – 2016. – Т. 7. – №. 1. – С. 11762.
6. Fedosov S. N., Nexø E., Heegaard C. W. Low methylcobalamin in liver tissues is an artifact as shown by a revised extraction procedure //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. – 2023. – Т. 1867. – №. 4. – С. 130315.
7. Krams C. et al. The cobalamin processing enzyme of *Trichoplax adhaerens* //Journal of Biological Chemistry. – 2025. – Т. 301. – №. 2. – С. 108089.
8. Rempel S. et al. Cysteine-mediated decyanation of vitamin B₁₂ by the predicted membrane transporter BtuM //Nature Communications. – 2018. – Т. 9. – №. 1. – С. 3038.
9. Kim J., Gherasim C., Banerjee R. Decyanation of vitamin B₁₂ by a trafficking chaperone //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Т. 105. – №. 38. – С. 14551-14554.
10. Niesen F. H., Berglund H., Vedadi M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability //Nature protocols. – 2007. – Т. 2. – №. 9. – С. 2212-2221.

ОБОСНОВАННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ НЕФРОПРОТЕКЦИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ

Сорокина Л. Е.¹, Шевандова А. А.², Фомочкина И. И.²

¹ *Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт
им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», Центральная
научно-исследовательская лаборатория*

² *Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт
им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», кафедра
базисной и клинической фармакологии*

e-mail: leya.sorokina@mail.ru

PROVEN DIRECTIONS OF NEPHROPROTECTION IN EXPERIMENTAL METABOLIC SYNDROME

Sorokina L. E.¹, Shevandova A. A.², Fomochkina I. I.²

¹*Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S. I. Georgievsky,
Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Vernadsky
Crimean Federal University", Central Research Laboratory*

²*Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S. I. Georgievsky,
Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Vernadsky
Crimean Federal University", Department of Basic and Clinical Pharmacology*

По современным представлениям метаболический синдром (МС) имеет доминирующее значение в увеличении распространенности хронической болезни почек (ХБП). Нефропротективная терапия позволяет снизить риск развития терминальной стадии ХБП до 50% [1]. Поэтому одним из приоритетных вопросов современной медицинской науки является разработка комплексных стратегий, направленных на улучшение почечных исходов у пациентов с метаболическим синдромом [2 - 3].

Целью настоящего исследования был поиск и оценка влияния различных терапевтических подходов (полифенолы, блокатор рецепторов ангиотензина II и сахароснижающие препараты) на почечное повреждение в экспериментальной

модели МС.

Задачи исследования:

- 1) Смоделировать МС: индуцировать МС у крыс путем кормления диетой с высоким содержанием фруктозы (60%) в течение 24 недель.
- 2) Выделить ключевые патофизиологические механизмы развития нефропатии при метаболическом синдроме.
- 3) Провести комплексный сравнительный анализ эффективности различных стратегий нефропротекции при экспериментальном метаболическом синдроме.

Материалы и методы. В качестве модели метаболического синдрома была выбрана фруктозная модель: в течение 24 недель экспериментальные животные получали стандартный твердый корм «Комбикорм ЛБК-120» (ГОСТ 23462-2019, РФ) с 60%-содержанием фруктозы. Начиная с 14 недели, на фоне продолжающегося применения фруктозы, вводились различные терапевтические композиции и их комбинации.

Исследование проведено на 80 лабораторных крысах-самцах линии Wistar (питомник ООО «СМК СТЕЗАР», РФ), возрастом 2,5-3 месяцев и массой 300 г, разделенных в зависимости от применяемой терапевтической стратегии на следующие группы (n=10): МС – метаболический синдром без коррекции; МС + БКЛВ – метаболический синдром с коррекцией концентратом полифенолов лозы винограда безалкогольным пищевым (БКЛВ) (НИЦ «Курчатовский институт» – «Магарач», Россия); МС + КСВ – с коррекцией концентратом семян винограда безалкогольным пищевым (КСВ) (НИЦ «Курчатовский институт» – «Магарач», Россия); МС + БРА II – с коррекцией блокатором рецепторов ангиотензина II (БРА II) – азилсартана медоксомилом («Хеофарм», Россия); МС + ИНГКТ-2 – с коррекцией ингибитором натрий-глюкозного котранспортера-2 (ИНГКТ-2) – ипраглифлозином («Астеллас Фарма», Япония); МС + ИДПП-4 – с коррекцией ингибитором дипептидилпептидазы-4 (ИДПП-4) – гозоглиптином (Фармасинтез-Тюмень, Россия) с 14 недели эксперимента; МС + БРА II + БКЛВ – с коррекцией комбинацией азилсартана медоксомила и концентрата

полифенолов лозы виноград; контрольная группа (КГ).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась в R (версия 4.3.3) (R Core Team, 2024) с использованием библиотеки WRS версии 0.44 (<https://github.com/nicebread/WRS>).

Результаты исследования. Модель метаболической нефропатии у крыс продемонстрировала типичные нарушения: повышение креатинина и мочевины, снижение общего белка, увеличение маркеров повреждения ренального тропонина (NGAL), коллагена 4-го типа (Col-4), цистатина С (Cys-C).

На фоне приема БРА II отмечено временное повышение мочевины и креатинина, но увеличение общего белка указывает на снижение альбуминурии. Сартан нормализовал уровень Col-4 и Cys-C, но не NGAL, что говорит о частичной эффективности в отношении тубулоинтерстициального фиброза.

Прием Ипраглифлозина снижал уровень креатинина и повышал уровень общего белка, однако способствовал росту мочевины (вероятно, из-за осмотического диуреза), также наблюдалось снижение NGAL, Col-4 и Cys-C.

Гозоглиптин нормализовал показатели общего белка и мочевины, уменьшил концентрацию Col-4 и NGAL, в отличие от Cys-C.

В группах МС+БКЛВ и МС+КСВ отмечена тенденция к нормализации мочевины и общего белка, без влияния на креатинин, при этом БКЛВ показал более выраженный нефропротективный эффект по маркерам повреждения.

Комбинация БКЛВ + БРА II продемонстрировала наибольший нефропротективный потенциал: снижение креатинина, мочевины, протеинурии, увеличение общего белка и снижение уровней Col-4, Cys-C, NGAL.

Выводы. Комплексный сравнительный анализ эффективности различных терапевтических стратегий при экспериментальном МС позволил установить наиболее выраженный нефропротективный потенциал при использовании комбинации БКЛВ+БРА II. На клеточно-молекулярном уровне применение терапевтической композиции БКЛВ+БРА II сопровождалось снижением креатинина, мочевины, протеинурии, увеличением общего белка и достоверным снижением маркеров повреждения почек (Col-4, Cys-C, NGAL) по данным ИФА,

снижением активности воспаления и оксидантного стресса, а также восстановлением архитектуры почечной ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-25-20132.

Литература:

1. Kovesdy C.P. Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022. *Kidney Int. Suppl.* (2011). 2022;12(1):7-11. <https://doi.org/10.1016/j.kisu.2021.11.003>
2. Шамхалова М.Ш., Викулова О.К., Железнякова А.В., и др. Эпидемиология хронической болезни почек у пациентов с диабетом в Российской Федерации по данным Федерального регистра сахарного диабета (2010–2022 гг.). *Сахарный диабет.* 2023.26(5):404-417.
3. Francis, A., Harhay, M.N., Ong, A.C.M. et al. Chronic kidney disease and the global public health agenda: an international consensus. *Nat. Rev. Nephrol.* 2024;20:473–485. <https://doi.org/10.1038/s41581-024-00820-6>

ЭФФЕКТЫ СОЕДИНЕНИЯ 745-В-40 В БАТАРЕЕ ПСИХОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТОВ У КРЫС WISTAR, ПОДВЕРГШИХСЯ ДПФС

Степанова Е.В.^{1,2}, Саванец О.Н.², Сикита Д.В.², Гуринович Е.В.³

¹*Белорусский государственный медицинский университет, кафедра
фармакологии*

²*Институт биоорганической химии НАН Беларуси*

³*Институт физико-органической химии НАН Беларуси
stepanovamay@gmail.com*

EFFECTS OF COMBINATION 745-B-40 IN A BATTERY OF PSYCHOPHARMACOLOGICAL TESTS IN RATS WISTAR, SUBJECTED TO DPPS

Stepanova E.V., Savanets O.N., Sikita D. V., Gurinovich E.V.

Belarusian State Medical University

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus

Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus

Цель. Экспериментальное изучение психофармакологического действия трипептида 745-B-40 в условиях 72-часовой депривации парадоксальной фазы сна (ДПФС).

Актуальность. Парадоксальный сон (также обозначаемый как REM-сон, БДГ-сон, быстрый сон) представляет собой финальную стадию стандартного цикла сна и обладает рядом характерных нейрофизиологических признаков. Согласно исследованиям Э. Хартманна, степень восстановления психоэмоционального состояния в течение ночного сна в значительной мере определяется длительностью фазы быстрого сна (REM-фазы). Отмечается, что в периоды эмоционального благополучия, высокой мотивации и отсутствия стрессовых факторов наблюдается тенденция к сокращению продолжительности этой стадии сна. В то же время, согласно выводам Р. Гринберга, Д. Коэна и их коллег, REM-сон играет критически важную роль в процессах психологической адаптации к эмоционально насыщенным, необычным или стрессогенным ситуациям. Именно поэтому фаза быстрого сна представляет собой критически важный компонент адаптационных механизмов [1], способствующих поддержанию психического гомеостаза как на индивидуальном, так и на социокультурном уровнях. Современные тенденции к увеличению распространённости психических заболеваний, суицидального поведения и криминальных проявлений могут быть частично интерпретированы как следствие уменьшения продолжительности парадоксальной стадии сна, что подчеркивает её значимость в контексте психофизиологической регуляции и

профилактики дезадаптивных состояний.

Методы. В экспериментах изучено корректирующее влияние соединения 745-В-40 на поведение крыс-самцов Wistar, нарушенное депривацией парадоксальной фазы сна в течение 72-часов по методике D.Jouvet. Изучена динамика горизонтальной (ГДА) и вертикальной (ВДА) двигательной активности в условиях актометрии в аппарате “Ugo Basille” [2], поведение в тесте подныривания под край цилиндра (Бондаренко Н.А, 1990) и интенсивность агрессивных столкновений, спровоцированных электрическим током.

Результаты и их обсуждение. Применение соединения 745-В-40 существенно не влияло на горизонтальную и вертикальную двигательную активность самцов крыс Wistar, подвергшихся ДПФС, однако способствовало снижению числа безуспешных попыток избавления в сравнении со стрессированным контролем в тесте экстраполяционного избавления. Применение соединения 745-В-40 также приводило к возрастанию числа N оборонительных реакций, редуцированных после ДПФС в сравнении с интактными животными (таблица 1).

Таблица 1 - Влияние 745-В-40 на уровень оборонительного поведения у крыс Wistar, подвергшихся ДПФС

Группа, образец, доза	Среднее число атак с укусами за 2 мин	Среднее число атак с укусами за 3 мин	ΔN
К-1, Р и/н	1,4	1,1	$0,3 \pm 0,3$
К-2, Р и/н+ДПФС	2,4	1,4	$-1,2 \pm 0,3^1$
ОГ, 745-В-40, 10 мкг/кг и/н +ДПФС	0,8	1,1	$0,3 \pm 0,8$

Выводы. Трипептид 745-В-40 снижает число стереотипных безуспешных попыток избавления и повышает уровень конкурентной активности крыс, сниженной в результате дезадаптации (переохлаждение, изоляция, изоляционный стресс, нарушения сна).

Литература:

1. Бондаренко, Н.А. Избирательное влияние нейролептиков на дофаминзависимое нарушение поведения крыс в тесте экстраполяционного избегания / Н. А. Бондаренко // Бюл. эксперим. биол. и медицины. — 1990. — № 11. — С. 506–508.
2. Кравченко, Е. В. Влияние изменений состояния нейромедиаторных и пептидергической систем мозга на циркадианные ритмы и поведение крыс / Е. В. Кравченко, Л. М. Ольгомец // Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. — 2012. — Т. 62, № 4. — С. 453–464.

**ИНГИБИРОВАНИЕ PSMD10 И ЕГО ВОЗДЕЙСТВИЕ НА
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ:
КОМБИНИРОВАННЫЕ ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ**

Травникова Д.Ю.^{1,2}, Абакумова Т.О.², Котелевцев Ю.В.¹

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет

Пирогова, Москва, Россия

e-mail: darija-travnikova@yandex.ru

**INHIBITION OF PSMD10 AND ITS IMPACT ON GLIOBLASTOMA CELL
VIABILITY: COMBINED THERAPEUTIC APPROACHES**

Travnikova D.Yu.^{1,2}, Abakumova T.O.², Kotelevtsev Yu.V.¹

¹ Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Глиобластома является одной из самых агрессивных и трудно поддающихся лечению форм рака, что делает поиск эффективных терапевтических стратегий особенно актуальным. Предварительные исследования свидетельствуют о том, что PSMD10 гиперэкспрессируется в данном типе опухолей и связан с ее способностью к развитию резистентности

опухолевых клеток к химиотерапии, что подчеркивает его потенциальную роль в прогрессии заболевания.

Цель: изучить влияние ингибирования PSMD10 с помощью малых интерферирующих РНК пролиферацию клеток глиобластомы и их чувствительность к химиотерапии

Методы: трансфекция; проведение тестов на жизнеспособность; проточная цитометрия; конфокальная микроскопия, ПЦР, вестерн блот, РНК-секвенирование, создание ортотопической и ксенотрансплантантной модели глиобластомы на мышах, MPT, IVIS.

Результаты: Экспрессия гена PSMD10 значительно повышена в образцах глиобластомы и составляет 6,2, в то время как в нормальных мозговых тканях — 5,8. Подобраны миРНК, которые снижают экспрессию на 90%. Нокдаун ганкирина уменьшил выживаемость клеток GL261 на 40% и увеличил апоптотическую активность на 30-37% в GL261 и СТ-2А. После нокдауна PSMD10 70% клеток GL261 находились в фазе G1, замедляя клеточный цикл. Анализ транскриптома СТ-2А показал, что ингибирование PSMD10 связано с понижением экспрессии генов G2M и путей NF-κB, а также активацией генов иммунного ответа. Комбинированная терапия миРНК с темозоломидом показала, что нокдаун снижает в 3 раза IC50 к ТМЗ в резистентных СТ-2А клетках. В *in vivo* экспериментах была продемонстрирована эффективность использования миРНК в лечении глиобластомы.

Выводы: Ингибирование PSMD10 с помощью миРНК значительно повышает чувствительность клеток глиобластомы к химиотерапии и замедляет их пролиферацию.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (соглашение No 22-75-10151-П).

ИНТЕГРИН $\alpha 3 \beta 1$ КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

**Файзуллина Э.А., Малабуйок Д.М., Серова О.В., Мокрушина Ю.А., Смирнов
И.В., Габибов А.Г., Терехов С.С.**

ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М.

Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

e-mail: faiz.eline2000@yandex.ru

INTEGRIN $\alpha 3 \beta 1$ AS A TARGET FOR IMMUNOTHERAPY OF SOLID TUMORS

**Faizullina E.A., Malabuiok D.M¹, Serova O.V, Mokrushina Y.A., Smirnov I.V,
Gabibov A.G., Terekhov S.S.**

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry

Патологические процессы, лежащие в основе формирования солидных опухолей, приводят к возникновению опухолевых антигенов, которые вызывают иммунный ответ, характеризующийся наличием опухоль-инфильтрирующих Т- и В-лимфоцитов. При рассмотрении опухоли и ее микроокружения на молекулярном уровне, обнаруживается гиперпродукция белков, связанных с пролиферацией, ангиогенезом и адгезией. Целью нашего исследования является разработка новых эффективных препаратов, а также определение новых мишеней для терапии рака, посредством изучения репертуара человеческих антител, продуцируемых В-клетками пациентов с солидными опухолями.

Из репертуара антител В-клеток, инфильтрирующих опухоль пациента с аденокарциномой восходящей ободочной кишки было реконструировано антитело В3.4. Было выявлено специфичное связывание антитела В3.4 с несколькими раковыми клеточными линиями, включая MDA-MB-231. Масс-спектрометрический анализ выявил, что мишенью В3.4 может быть интегрин $\alpha 3 \beta 1$ — мембранный белок, гиперэкспрессируемый в солидных опухолях и ассоциированный с агрессивным ростом, инвазией, метастазированием и неблагоприятным прогнозом для терапии.

Для подтверждения специфичности антитела к интегину $\alpha\beta 1$, методом CRISPR/Cas9 получены клетки MDA-MB-231, нокаутные по генам ITGA3, ITGB1, а также, посредством лентивирусной трансдукции, получены клетки линии HEK293T, гиперэкспрессирующие гены ITGA3 и ITGB1. Анализ методом проточной цитофлуориметрии показал отсутствие связывания антитела В3.4 с клетками, нокаутными по данным генам и появление связывания с В3.4 клеток, гиперэкспрессирующих ITGA3 и ITGB1.

Цитофлуориметрический анализ первичных культур клеток толстого кишечника пациентов показывает специфическое связывание В3.4 с антигеном на поверхности опухолевых клеток, при этом связывания В3.4 со здоровыми клетками не наблюдается. По данным цитофлуориметрии в различных условиях, В3.4 связывается с интегрином $\alpha\beta 1$, находящимся в неактивной конформации. Полученные результаты указывают на то, что антитело В3.4 может связывать уникальный конформационный эпитоп, ассоциированный с патологическим состоянием опухолевой ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 23-44-00043).

ВАЛИДИРОВАНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ФАРМОКОЛОГИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ IN VIVO ПРИ ПОМОЩИ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

**Шашковская В.С.^{1,2}, Цитрина А. А.³, Андрейченко И. Н.², Микаелян А. С.³,
Халимани Н.², Нестерчук М. В.², Верлов Н. А.⁴, Котелевцев Ю. В.²**

*¹Институт трансляционной медицины, Российский научный
исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова*

*²Центр реабилитации и нейрореабилитации им. Владимира Зельмана,
Сколковский институт наук и технологий*

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

*⁴Ресурсный центр ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ
e-mail: verashashkovskaya@gmail.com*

VALIDATION OF PROMISING TARGETS IN VIVO USING RNA- INTERFERENCE

**Vera S. Shashkovskaya^{1,2}, Alexandra A. Tsitrina³, Irina N. Andreichenko², Arsen
S. Mikaelyan³, Noreen Halimani², Mikhail V. Nesterchuk², Nikolay A. Verlov⁴,
Yuri V. Kotelevtsev²**

¹Pirogov Russian National Research Medical University

*²Vladimir Zelman Center for Neurorehabilitation, Skolkovo Institute of Science and
Technology*

³Koltsov Institute of Developmental Biology

⁴Resource Center of the Kurchatov Institute National Research Center

Введение: РНК-интерференция является относительно новым подходом для подавления экспрессии генов с помощью малых интерферирующих РНК (миРНК), которые служат короткими двухцепочечными последовательностями (21-30 нуклеотидов) [1]. миРНК являются перспективным инструментом для усовершенствованной доставки лекарств для лечения многих заболеваний, включая нейродегенеративные заболевания и фиброз печени. Для увеличения проницаемости миРНК в клетки, предотвращения иммунного ответа и деградации миРНК посредством нуклеаз разрабатываются различные методы доставки миРНК, такие как липидные наночастицы (ЛНЧ), липосомы, мицеллы и функциональные полимерные системы [2]. Фиброз печени является патологическим процессом пролиферации тканей в печени при ее повторном повреждении, который вызван различными патогенными факторами и в котором участвуют воспалительные реакции [3]. Терапия, направленная на лечение фиброза ограничена своими побочными эффектами и отсутствием доказанной эффективности, что делает ее непригодной. Боковой амиотрофический склероз (БАС) является прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, поражающим верхние и нижние двигательные нейроны, что приводит к мышечной слабости, параличу и смерти [4]. Одобренные препараты для лечения БАС направлены на устранение симптомов заболевания и увеличивают

продолжительность жизни на несколько месяцев, в связи с чем требуется поиск более эффективного лечения БАС.

Методы: Используемые миРНК к генам Has2 и IRF5 были упакованы в ЛНЧ, в качестве контроля использовалась миРНК к гену люциферазе светлячка (siLuc), также упакованная в ЛНЧ. В данной работе использовалась трансгенная линия мышей FUS (1-359) в качестве модели БАС, которая экспрессирует мутантный белок FUS и из-за его склонности к агрегации вызывает протеинопатию у мышей [5]. Для моделирования фиброза печени проводились внутрибрюшинные инъекции CCl₄ в течение 14 дней. Терапия фиброза печени осуществлялась внутривенным введением малой молекулы 4-метилумблиферона (4-Mu) или ЛНЧ-siHas2. Для оценки терапии фиброза печени проводилось иммуногистохимическое окрашивание срезов печени на маркеры Clec4f, α -SMA, гиалуроновой кислоты (HA) и белка десмина. Также оценивались маркеры фиброза печени (АСТ, АЛТ, холестерин и коллаген I и III типа (Col1a1, Col3a1)) в крови мышей после терапии. Для оценки биораспределения миРНК к гену IRF5 и ЛНЧ-siIRF5 после внутрижелудочкового введения (AP: 1, ML: 0.5, DV: 2.8) миРНК были помечены радиоактивным ¹²⁵I, после чего упакованы в ЛНЧ и через 30 минут, 12, 24 и 72 часа оценивалось их накопление в органах. Результаты выражали как процент от введенной дозы на орган (%ID) или процент от введенной дозы на грамм органа (%ID/g). Для оценки эффективности терапии после внутрижелудочкового введения ЛНЧ-миРНК был проведен анализ выживаемости трансгенных мышей FUS (1-359), а также гистохимическое окрашивание срезов спинного мозга по методу Ниссля.

Результаты: Терапия мышей с фиброзом печени с помощью 4-Mu и ЛНЧ-siHas2 подавляло отложение коллагеновых волокон по сравнению с контрольными мышами. Однако, внутривенное введение ЛНЧ-siLuc также снижало отложение коллагена, но не в значительной степени. Была проведена количественная оценка колокализации клеток Купфера и stellatных клеток и показано, что 6% stellatных клеток колокализуются с 15% Купфера в здоровых мышах. Однако после индуцирования фиброза количество клеток обоих типов значительно

увеличилось. Лечение с помощью 4-Му и ЛНЧ-siHas2 значительно снизило долю обеих клеток в модели фиброза. Количественная оценка экспрессии АСТ и АЛТ в сыворотке крови мышей, которым вводили 4-Му, показало, что 4-Му не предотвращает начальное повреждение гепатоцитов, в то время как ЛНЧ-siHas2 вызывает сопоставимое снижение уровней АСТ и АЛТ в сыворотке крови. Лечение с помощью 4-Му значительно снижает экспрессии мРНК *Colla1*, *Col3a1* и α -SMA. Аналогично, терапия ЛНЧ-siHas2 понижает уровень экспрессии *Colla1* и α -SMA. Дополнительно было показано, что ЛНЧ-siHas2 значительно подавляет экспрессию α -SMA *in vivo*. Количество НА повышается после хронического воздействия CCl_4 , но снижается после введения 4-Му и ЛНЧ-siHas2, причем ЛНЧ-siHas2 оказывает наиболее сильное воздействие. Также нами было показано, что миРНК и ЛНЧ-миРНК лучше накапливаются в мозге после внутрижелудочкового введения и медленнее выводятся из мозга, сохраняя относительно высокую концентрацию (около 1% от введенной дозы) через 72 часа после введения. ЛНЧ-миРНК характеризуется более выраженным накоплением, чем миРНК без формуляции. Однако введение ЛНЧ-siIRF5 на поздней стадии заболевания не привело к увеличению жизни трансгенных мышей. Внутрижелудочковые инъекции на ранней стадии заболевания БАС увеличили продолжительность мышей с медианой выживаемости у леченых мышей 76 недель по сравнению с контрольными в 49 недель. Однако гистохимическое окрашивание двигательных нейронов по Нисслю не выявило значительных изменений между группами.

Список литературы:

1. Zhao, Z.; Lin, C.-Y.; Cheng, K. SiRNA- and MiRNA-Based Therapeutics for Liver Fibrosis. *Translational Research* **2019**, *214*, 17–29, doi:10.1016/j.trsl.2019.07.007.
2. Zare, M.; Pemmada, R.; Madhavan, M.; Shailaja, A.; Ramakrishna, S.; Kandiyil, S.P.; Donahue, J.M.; Thomas, V. Encapsulation of MiRNA and SiRNA into Nanomaterials for Cancer Therapeutics. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1620,

doi:10.3390/pharmaceutics14081620.

3. Nan, Y.; Su, H.; Lian, X.; Wu, J.; Liu, S.; Chen, P.; Liu, S. Pathogenesis of Liver Fibrosis and Its TCM Therapeutic Perspectives. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2022**, 2022, 1–12, doi:10.1155/2022/5325431.

4. Xie, Q.; Li, K.; Chen, Y.; Li, Y.; Jiang, W.; Cao, W.; Yu, H.; Fan, D.; Deng, B. Gene Therapy Breakthroughs in ALS: A Beacon of Hope for 20% of ALS Patients. *Transl Neurodegener* **2025**, 14, 19, doi:10.1186/s40035-025-00477-6.

5. Shelkovnikova, T.A.; Peters, O.M.; Deykin, A. V.; Connor-Robson, N.; Robinson, H.; Ustyugov, A.A.; Bachurin, S.O.; Ermolkevich, T.G.; Goldman, I.L.; Sadchikova, E.R.; et al. Fused in Sarcoma (FUS) Protein Lacking Nuclear Localization Signal (NLS) and Major RNA Binding Motifs Triggers Proteinopathy and Severe Motor Phenotype in Transgenic Mice. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, 288, 25266–25274, doi:10.1074/jbc.M113.492017.

РАЗРАБОТКА IN VITRO ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ИМИДЖИНГА КЛЕТОК ОТ ПАЦИЕНТА

**Южакова Д.В.¹, Изосимова А.В.¹, Сачкова Д.А.^{1,2}, Кононова А.И.^{1,2},
Шумская И.С.³, Гамаюнов С.В.³, Дуденкова В.В.¹, Елагин В.В.¹,
Щеславский В.И.¹, Яшин К.С.¹, Юсубалиева Г.М.⁴, Баклаушев В.П.⁴,
Ширманова М.В.¹**

¹Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава
России, НИИ Экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий

²Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет

им. Н. И. Лобачевского, Институт биологии и биомедицины

³Нижегородский областной клинический онкологический диспансер

⁴Федеральный научно-клинический центр специализированных видов
медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России

e-mail: yuzhakova-diana@mail.ru

**DEVELOPMENT OF THE IN VITRO PLATFORM FOR PREDICTION OF
THE EFFICIENCY OF THE IMMUNOTHERAPY BASED ON THE
METABOLIC IMAGING OF THE PATIENT-DERIVED CELLS**

***Yuzhakova D.V.¹, Izosimova A.V.¹, Sachkova D.A.^{1,2}, Kononova A.I.^{1,2},
Shumskaya I.S.³, Gamaynov S.V.³, Dudenkova V.V.¹, Elagin V.V.¹,
Shcheslavskiy V.I.¹, Yashin K.S.¹, Yusubalieva G.M.⁴, Baklaushev V.P.⁴,
Shirmanova M.V.¹***

¹Privolzhsky Research Medical University

²Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod

³Nizhny Novgorod Regional Oncologic Hospital

⁴Federal Research and Clinical Center, Federal Medical and Biological Agency

Ключевая проблема иммунотерапии опухолей связана с отсутствием надежных подходов для прогнозирования эффективности лечения. В качестве перспективной стратегии для оценки индивидуальной чувствительности пациентов к иммунотерапии рассматриваются *in vitro* тесты на основе опухолевого материала и иммунных клеток пациента.

Целью настоящего исследования является разработка оригинальной пациент-специфической платформы на основе опухолевых клеток пациента с иммунным окружением для оценки эффективности клеточного ответа на иммунотерапию.

В работе использованы опухолевые клетки глиом и меланом, выделенные из образцов операционного материала, а также лимфоциты периферической крови пациентов. Основным прижизненным методом оценки ответа клеток на терапию служила флуоресцентная время-разрешенная микроскопия FLIM. Оценивали параметры затухания автофлуоресценции кофактора НАД(Ф)Н, которые являются маркером метаболического состояния клетки. Верификация ответа проводилась путем оценки жизнеспособности клеток, а также экспрессии маркеров активации (CD25 и CD69) и пролиферации (Ki67).

Первой задачей было оценить потенциал данной платформы для

прогнозирования эффективности иммунотерапии чек-поинт ингибиторами анти-PD-1 или анти-CTLA-4 для пациентов. Установлено, что клетки конкретного пациента демонстрировали либо положительный ответ на действие препарата, что выражалось в повышении уровня гликолиза, активации и пролиферации лимфоцитов и/или снижении пролиферации и гибели опухолевых клеток, либо отсутствие ответа. Предварительно показана корреляция *in vitro* ответа клеточной модели с дальнейшим ответом пациента на терапию в клинике для меланомы, где чек-поинт ингибиторы входят в стандарт лечения.

Другим приложением данной платформы может стать тестирование новых агентов для иммунотерапии. Так, было показано, что новые “усиленные” линии натуральных киллеров для адоптивной и CAR терапии вызывали переключение метаболизма клеток глиомы пациентов к более «уязвимому» окислительному фенотипу, что в дальнейшем приводило к их гибели.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 23-74-10109).

ТЕХНОГЕНЕТИКА 2025

Первый Форум генетических технологий «Сириус.ТехноГенетика» стартовал в Научно-технологическом университете «Сириус» в 2025 году при поддержке федеральной территории «Сириус». Мероприятие объединило более 400 молодых исследователей, ведущих учёных и представителей высокотехнологичных компаний со всей страны.

Участники Форума обсудили вопросы, перспективы и ограничения генетических технологий, представили результаты собственных разработок и познакомились с последними достижениями этой быстро развивающейся отрасли. В числе участников и спикеров Форума были представители индустриальных партнеров Университета – «Хеликон», «Агрокомплекс им Н.И. Ткачева», «Химмед», «Молекулаб», «Бионлабс», «Биолайн», «ЭмбриоВЛ», «КвадросБио», «Лакопа», «Биолабмикс», «Альгавитапро», «Диаэм», «Синбиотех». А в выставочной зоне форума участники смогли познакомиться с новейшими разработками в области лабораторного оснащения для генетических и клеточных лабораторий, представленными спонсорами форума.

В первые три дня масштабного Форума прошли школы-конференции для молодых учёных и студентов профильных специальностей:

- ✓ Международная школа по синтетической биологии посвящена сборке генетических конструкций, обладающих заданными свойствами. Участники школы получили актуальные знания и практические навыки в предметной области от ведущих учёных страны;
- ✓ Международная школа-конференция «Технологии исторической генетики» познакомила с основными этапами экспериментальной работы с древней ДНК и биоинформатической обработкой данных;
- ✓ Школа-конференция «Современные проблемы и перспективы коллекций культур клеток: от создания до применения в науке и биомедицине» объединила специалистов в области клеточных технологий, генетики и биомедицины.

Участники программ узнали о передовых технологиях современной генетики от ведущих экспертов Научно-технологического университета «Сириус», получили практические навыки применения этих технологий, поделились собственными наработками и научными идеями.

Помимо школ молодых ученых, в рамках работы Форума прошло множество событий разного формата, в том числе круглые столы и мини-конференции. Среди самых ярких событий стоит отметить открытый лекторий по синтетической биологии, где с лекциями выступили ключевые специалисты в области продвижения технологий синтетической биологии, экспертную сессию «Биофабрики: Генетический тюнинг микроорганизмов – от гена до биореактора», посвященную конструированию микробных организмов для производства биотехнологически значимых веществ, мини-лекцию «О чем молчат ученые: как негативные результаты могут определять развитие науки», где специалисты обратили внимание на ошибки исследований, интерпретаций, недопредставленность результатов негативных исследований и влиянии всех этих явлений на судьбу науки и качество исследований и исследователей.

Отдельное внимание на Форуме было уделено проблеме генетической паспортизации сортов, для обсуждения которой, в рамках круглого стола были привлечены ведущие российские эксперты. А в рамках мини-конференции «Будущее геномных исследований в пищевой индустрии» появилась возможность создать платформу для диалога учёных и производителей индустрии, обсудить возможности генетических технологий и существующие на сегодняшний день разработки для каждого из пищевых направлений, определить потребности и пожелания производителей, уделить внимание эффективному трансферу технологий и научных решений в производство, включая разработку новых штаммов микроорганизмов для пищевой промышленности.

В рамках постерной сессии у студентов, аспирантов и молодых ученых была возможность представить результаты своих исследований и разработок в нестандартном и ярком формате научных комиксов.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ КОНЬЮГАТОВ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ И АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ С КУЛЬТУРАМИ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ

Аседулина М.Ш., Князева О.А.

*Естественно-географический факультет, БГПУ им. М. Акмуллы, Уфа,
Республика Башкортостан, Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Современная биомедицина исследует природные соединения для новых терапий. Одно из них — глицирризиновая кислота с противовоспалительными, антибактериальными и цитотоксическими свойствами. В сочетании с ацетилсалициловой кислотой может давать комбинированные эффекты, открывая возможности для лечения, в том числе онкологических заболеваний. Изучение их конъюгатов важно для понимания взаимодействий и влияния на клетки.

Каталаза — фермент, поддерживающий клеточный гомеостаз и защищающий от оксидативного стресса. О её активности при болезнях наблюдаются противоречивые данные: уровень активности повышается (рак шейки матки), а иногда снижается (рак молочной железы). Это указывает на необходимость дальнейших исследований, в том числе на модельных микроорганизмах, таких как *E.coli*.

Цель работы - Оценка биологических эффектов конъюгатов глицирризиновой и ацетилсалициловой кислот на модели культуры клеток *Escherichia coli* в перспективе исследования механизмов их противоопухолевого действия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: культура клеток бактерий *Escherichia coli*, глицирризиновая кислота (GA), ацетилсалициловая кислота (AsA), конъюгаты GA-AsA в соотношении 1:1 и 2:1. Препарат сравнения - стрептоцид (Str).

Микробиологические - получение биопленки; диско-диффузионный; определение минимальной ингибирующей концентрации; Фотометрические — Спектрофотометрия; Статистические – AtteStat

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Биотоксичностью обладают только ацетилсалициловая кислота и стрептоцид. В GA-AsA ацетилсалициловая кислота теряет свою биотоксичность.

Глицирризиновая кислота и ее конъюгаты с ацетилсалициловой кислотой оказывают ингибирующее действие на формирование бактериальной биопленки. Механизм действия, возможно, GA связан с нарушением кворум-сенсинга через модуляцию сигнальных молекул и снижение продукции полисахаридов.

Выявлена минимально субингибирующая концентрация под действием конъюгатов: GA-AsA (1:1) – 500 мкг/мл и 62,5 мкг/мл, GA-AsA (2:1) – 250 мкг/мл, что, позволяет использовать данные соединения в дальнейших экспериментах на животных

ВЫВОДЫ:

1. Биотоксичностью обладают только ацетилсалициловая кислота и стрептоцид.
2. Глицирризиновая кислота и ее конъюгаты с ацетилсалициловой кислотой оказывают ингибирующее действие на формирование бактериальной биопленки.
3. Зона подавления роста *E. coli* наиболее выражена под действием GA-AsA в молярном соотношении 2:1 при концентрации 62,5 мг/мл.

СИСТЕМ ДОСТАВКИ НА ОСНОВЕ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ ПО ДАННЫМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Ахметова А.И.¹, Яминский Д.И.¹, Никитин Н.А.², Яминский И.В.¹

¹*МГУ им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, Россия*

²*МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Вирусы встречаются в широком диапазоне форм и размеров, благодаря чему, в частности вирус табачной мозаики (ВТМ) можно использовать в качестве калибровочного эталона. Растительные вирусы обладают химическими функциональными возможностями, потенциально могут быть использованы в качестве средства доставки. При сравнении антигенных свойств сферических частиц (СЧ) и нативных вирионов ВТМ было показано, что при термической денатурации появляются новые конформационные эпитопы, благодаря которым СЧ обладают более высоким иммуностимулирующим потенциалом (Мешков Г., 2012).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Для исследования процесса структурного перехода ВТМ в модифицированные СЧ во времени с помощью сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) были подготовлены образцы вируса с концентрацией 0,01 мг/мл, образцы нагревали до 90 °С, наносили на слюду и высушивали. Данные получали с помощью СЗМ FemtoСкан и анализировали в ПО FemtoСкан Онлайн (Karova, O., 2012, Ахметова, А.И., 2024).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: При нагреве частицы сначала раскручиваются из спиралевидной формы, истончаются концы частиц, меняется высота частиц (уменьшается до 11-13 нм). Частицы распластываются на подложке.

Частицы становятся более гибкими, принимают на подложке изогнутую форму, при этом, как правило, характерные формы образованы не одиночными частицами, а сборками из нескольких палочек. Они выстраиваются не только торец в торец друг к другу, но и смыкаются вдоль, образуя формы, напоминающие лодочки (рис.1.). Следующий этап, характерный для

образования шариков, – это форма гантелей. Вероятно, шарики в гантелях образуются не из частицы целиком, а из половины частицы (65 сегментов по 2.3 нм), которые формируют шарик диаметром около 20-30 нм. Но между шариком и родительской палочкой остаются связи, поэтому на торцах палочки формируются шарики, придавая её форму гантели (рис.2).

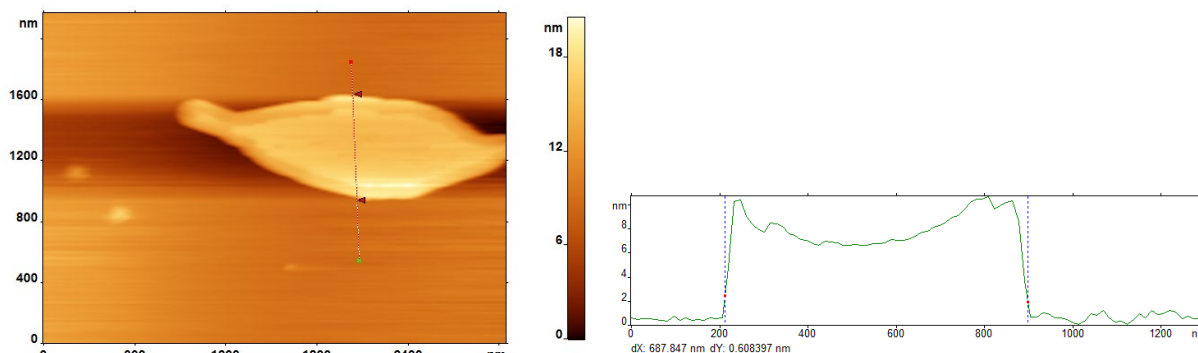


Рисунок 1 - АСМ изображение и сечение ВТМ после нагрева в течение 1 мин. Высота структур менее 10 нм, при этом ширина составляет около 700 нм.

Предпоследний этап формирования СЧ, вероятно, происходит довольно динамично в результате накопления энергии для перехода, т.к. именно эту стадию увидеть не удалось.

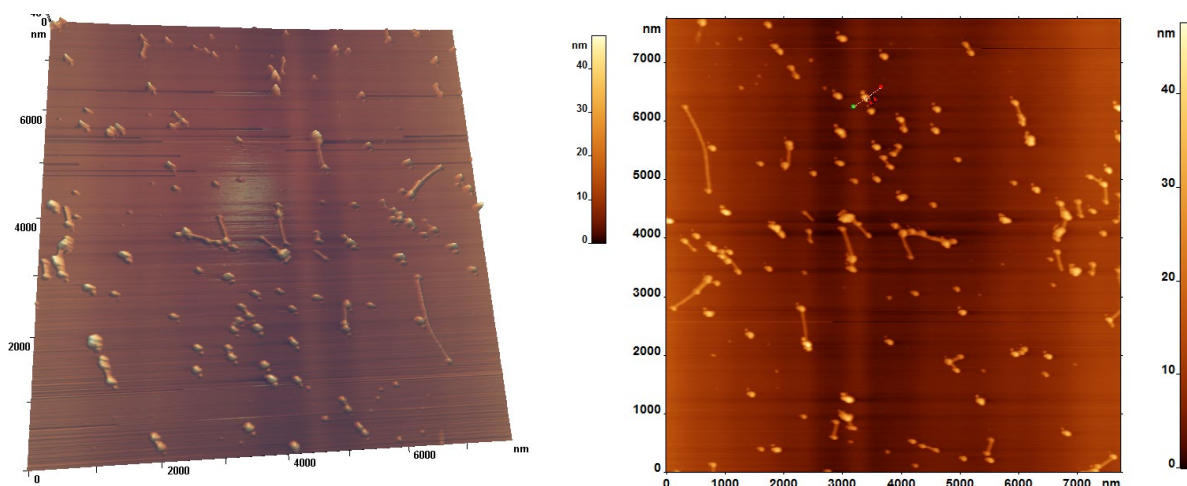


Рисунок 2 - 3D, 2D изображения процесса формирования СЧ. Атомно-силовая микроскопия. Образец предварительно нагрет в течение 5 мин. Среднее значение высоты СЧ 32,8 нм.

Форма СЧ довольно гладкая, СЧ не агрегируют, а распределяются по поверхности подложки. Есть прямая зависимость процесса образования и размера СЧ от концентрации – чем больше концентрация, тем медленнее процесс образования шариков, они становятся большего диаметра.

В ПО ФемтоСкан Онлайн произвели расчет периметра, площади, объема, среднеквадратичной шероховатости, наибольшей (Н) и средней ($\langle N \rangle$) высоты частицы. По полученным данным объем одного шара значительно превышает объем частицы – примерно в два раза. При этом периметр и площадь шарика меньше периметра и площади частицы примерно в два раза.

ВЫВОДЫ: В рамках данной работы были получены данные об образцах ВТМ, с помощью СЗМ и ПЭМ. Получены геометрические характеристики частиц, показано изменение формы частиц и характера расположения на слюде вследствие нагревания до 90°C. Показана зависимость процесса структурного перехода от концентрации частиц. На примере вируса табачной мозаики продемонстрированы возможности применения метода сканирующей зондовой микроскопии для определения морфологии и характера адсорбции вирусных частиц на подложке.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Работа выполнена при поддержке
Междисциплинарных научно-образовательных школ Московского
университета, проект № 23-Ш04-04.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА И ДЕТЕРМИНАНТ УСТОЙЧИВОСТИ К ФАКТОРАМ СРЕДЫ ДЛЯ МАРКЕР- АССОЦИИРОВАННОЙ СЕЛЕКЦИИ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ УРАЛА

**Васильева Ю.С., Чертов Н.В., Сбоева Я.В., Жуланов А.А.,
Боронникова С.В.**

Кафедра ботаники и генетики растений, ПГНИУ, Пермь, Россия

Увеличение антропогенной нагрузки и эксплуатации лесов приводит к

повышению чувствительности лесных видов к факторам среды. Для изучения генетического разнообразия древесных растений применяется молекулярное маркирование и секвенирование геномов. В Уральском регионе сосредоточены уникальные сочетания генотипов, так как здесь расположена зона гибридизации многих видов.

Цель – изучение генетического разнообразия, выявление детерминант устойчивости к факторам среды и проведение генетической паспортизации лесообразующих хвойных растений Урала для применения в маркер-ассоциированной селекции. Объектами исследований являлись 14 популяций сосны обыкновенной, 8 – комплекса елей обыкновенной и сибирской и 15 – западной расы лиственницы сибирской на Урале. Общие параметры генетического разнообразия и структуры были изучены с помощью молекулярных SSR-, ISSR- и SNP-маркеров. Генетическое маркирование геномов изученных видов обнаружило как средние, так и высокие значения генетического разнообразия. Анализ генетической структуры показал, что популяции высокодифференцированы и обозначил пути формирования популяционной структуры видов в регионе. Для *P. sylvestris* выявлена тенденция к снижению генетического разнообразия с запада на восток. Изучены локусы, полиморфизм которых потенциально адаптивен. Проведена молекулярно-генетическая идентификация трех видов хвойных растений, разработаны SNP-панели и способ их использования для отбора форм деревьев с адаптивным потенциалом к засухоустойчивости, тестированный путем оценки скорости роста корня в условиях водного дефицита. Положено начало формирования коллекции семян сосны обыкновенной и ели сибирской для маркер-ассоциированной селекции. Основные показатели генетического полиморфизма изученных видов оказались средними в регионе, установлены закономерности формирования их генетической структуры. Выявлены потенциальные генетические детерминанты устойчивости к засухе, перспективные для дальнейшего изучения. Разработаны SNP-панели для отбора форм деревьев в маркер-ассоциированной селекции. Рекомендованы партии семян для

дальнейшего отбора.

Выполнено при частичном финансировании гос. задания № ФСНФ-2023-0004, проект № С-26/776.

ВЫРАЩИВАНИЕ РЕДКИХ ГРИБОВ (ЛЬВИНАЯ ГРИВА, ШИИТАКЕ, РЕЙШИ, СИНЯЯ ВЕШЕНКА И ДРУГИЕ, В ДОЛГОСРОЧНОЙ ПЕРСПЕКТИВЕ ТРЮФЕЛИ) НА ПИЩЕВЫХ ОТХОДАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Веремьев Д.Н.

*Кузбасский государственный аграрный университет им. В.Н. Полецкого,
Кемерово, Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Актуальность работы: В современном мире обострились две ключевые проблемы: необходимость перехода к устойчивому, ресурсосберегающему сельскому хозяйству и растущий объем пищевых отходов, составляющих значительную часть твердых бытовых отходов. Параллельно наблюдается рост потребительского и медицинского интереса к редким грибам (таким как львиная грива, шиитаке, рейши, синяя вешенка), обладающим высокой пищевой ценностью и доказанными терапевтическими свойствами. Их традиционное выращивание требует значительных затрат на субстрат. Интеграция умных технологий, в частности искусственного интеллекта (ИИ), позволяет перейти от эмпирического к прецизионному сельскому хозяйству, максимально повышая эффективность и предсказуемость биопроцессов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: В качестве субстрата использовались стандартизированные пищевые отходы ресторанного бизнеса и общественного питания: отработанная кофейная гуща, овощные очистки, перетёртые кости, скорлупа.

Выращивание вышеупомянутых грибов, полученных из коллекции, проводилось в специально сконструированных климатических камерах, оборудованных датчиками температуры, влажности воздуха и субстрата, уровня CO₂ и освещенности; данные с датчиков в реальном времени поступали в систему управления на основе машинного обучения. Алгоритм анализировал текущие условия, сравнивал их с эталонными моделями роста для каждого вида грибов и автоматически корректировал работу климатического оборудования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Пищевые отходы показали высокую эффективность в качестве питательной основы для всех исследуемых видов, кроме рейши, которому потребовалась дополнительная целлюлозная добавка. Наивысший выход биомассы был зарегистрирован у синей вешенки и львиной гривы на субстрате из кофейной гущи и соломы.

Использование системы управления на основе ИИ позволило стабильно поддерживать оптимальный микроклимат, что привело к сокращению цикла выращивания в среднем на 15% и увеличению прогнозируемого выхода урожая на 20-30% по сравнению с ручным управлением. Алгоритм успешно предсказывал пики плодоношения и выявлял аномалии, свидетельствующие о возможном развитии контаминантов.

ВЫВОДЫ:

1. Разработана и успешно апробирована устойчивая технология выращивания ценных видов грибов (львиная грива, шиитаке, синяя вешенка) на основе пищевых отходов.
2. Внедрение системы управления микроклиматом на базе искусственного интеллекта доказало свою высокую эффективность, значительно повысив урожайность, предсказуемость и рентабельность процесса.
3. Полученная грибная продукция соответствует высоким стандартам качества и пищевой ценности.
4. Технология является масштабируемой и может быть адаптирована для малого и среднего бизнеса, а также для городского фермерства.

**ПОЛОВОЙ ДИМОРФИЗМ В ГЕНЕТИЧЕСКОЙ И КЛЕТОЧНОЙ
РЕГУЛЯЦИИ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ У *DROSOPHILA
MELANOGASTER*.**

Веселкина Е.Р., Рощина Н.В., Пасюкова Е.Г.

¹*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный
исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия*

Мы показали, что генетические механизмы, регулирующие продолжительность жизни, обладают тканевой и половой специфичностью. Используя в качестве модели протеинкиназу GSK3, мы установили, что изменение уровня экспрессии гена *shaggy* в определенных тканях и даже отдельных клетках оказывает различное влияние на ПЖ самцов и самок.

ВВЕДЕНИЕ: Многочисленные данные убедительно свидетельствуют о значительных различиях средней и максимальной продолжительности жизни (ПЖ) у самцов и самок различных видов животных, включая млекопитающих. За последние столетие ПЖ человека значительно выросла, что в первую очередь обусловлено достижениями в области медицины и повышением качества жизни, при этом половой диморфизм по данному признаку был и остается характерным и для человека. В настоящее время все еще нет полной ясности относительно того, каким путем реализация генетических программ во всем организме в целом и изолированно в отдельных тканях и клетках может влиять на ПЖ. Исследование влияния тканеспецифической экспрессии генов на ПЖ в контексте полового диморфизма является важной задачей современной геронтологии. В рамках данного исследования был поставлен вопрос о том, может ли экспрессия ключевых регуляторных генов и кодируемых ими белков в соматических тканях, напрямую не связанных с репродуктивной функцией, опосредовать системные эффекты на ПЖ каждого пола.

Среди ключевых регуляторов основных функций организма мы выбрали для исследования ген *shaggy (sgg)*, кодирующий у модельного объекта, плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, высококонсервативную серин-треониновую

протеинкиназу GSK3, Данный фермент является ортологом человеческой протеинкиназы GSK3 β . GSK3 осуществляет регуляцию широкого спектра фундаментальных процессов, включая метаболизм, пролиферацию и ответ на клеточный стресс, посредством фосфорилирования широкого пула белков-мишеней, в том числе ключевых транскрипционных факторов (Patel, P., 2017). Особый интерес в контексте нашей работы представляет роль GSK3 в нервной системе. Показано, что эта протеинкиназа критически важна не только для развития нейронов, синаптогенеза и поддержания синаптической пластичности, но и является важным игроком в патогенезе нейродегенеративных заболеваний (Jope, R.S., 2007). Нарушения в работе GSK3-зависимых регуляторных каскадов, связанные с ее гиперактивацией или дисфункцией, ассоциированы с такими патологиями, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, что делает GSK3 одной из наиболее перспективных мишеней для фармакологической интервенции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Для направленной активации ‘экспрессии специфических транскриптов гена *sgg* была использована классическая двухкомпонентная система GAL4-UAS. Для увеличения активности использовали линию с трансгеном, кодирующим основной транскрипт гена *sgg*, *sggRB* (нормальную активную РВ-форму GSK3). Линию с трансгеном, кодирующим мутантный транскрипт *sggRB-A81T* (РВ форму GSK3 с аминокислотной заменой аланина на треонин в 81 положении, приводящей к отсутствию активности трансгенной GSK3 и доминантному негативному эффекту в отношении клеточной GSK3), использовали для уменьшения уровня активности GSK3. Линии-драйверы, кодирующие дрожжевой регуляторный белок GAL4 под контролем специфических промоторов, использовали для индукции трансгенов в различных нейронах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Сверхэкспрессия нормальной активной формы протеинкиназы GSK3 во всех нейронах вызывала значительное сокращение ПЖ у особей обоего пола. Однако ПЖ самцов снижалась в значительно большей степени, чем ПЖ самок. Чтобы более детально изучить зависимое от пола влияние увеличения активности GSK3 в соматических клетках

на ПЖ, мы индуцировали экспрессию нормальной активной GSK3 в дофаминергических, холинергических, пептидергических, глутаматергических, ГАМКергических и моторных нейронах. Сверхэкспрессия активной GSK3 во всех протестированных типах нейронов приводила к снижению ПЖ, однако выраженность эффекта варьировала. Наиболее драматичный эффект был выявлен в дофаминергических нейронах: сверхэкспрессия привела к летальности у особей обоих полов. Высокую чувствительность продемонстрировали пептидергические нейроны, тогда как глутаматергические и холинергические оказались менее чувствительными. Наименьшее влияние на ПЖ наблюдалось при сверхэкспрессии в мотонейронах и ГАМКергических нейронах. Степень сокращения ПЖ также зависела от пола.

Сверхэкспрессия неактивной формы протеинкиназы GSK3, приводящая к снижению суммарной активности GSK3 в клетках, во всех нейронах вызвала снижение ПЖ самцов и самок. Снижение активности GSK3 в дофаминергических, глутаматергических, ГАМКергических и моторных нейронах снизило ПЖ самцов, а в холинергических и пептидергических не повлияло на неё. В то же время, ПЖ самок изменилась, причем увеличилась, лишь в одном случае – при сверхэкспрессии неактивной формы протеинкиназы GSK3 в дофаминергических нейронах.

Эти интригующие результаты заставили нас более пристально взглянуть именно на дофаминергическую систему. У дрозофилы она состоит всего из 125 нейронов на полушарие головного мозга; клеточные тела нейронов сгруппированы в кластеры и легко визуализируются. Интересно было понять, какие именно кластеры дофаминергических нейронов вносят вклад в контроль ПЖ и одинаковы ли они у самцов и самок.

Для выявления вклада отдельных групп нейронов в наблюдаемые зависимые от пола эффекты в отношении ПЖ необходима высокая клеточная специфичность индукции трансенов. Для изменения активности GSK3 в отдельных кластерах дофаминергических нейронов мы использовали модификацию классической экспрессионной системы GAL4-UAS, Split_GAL4.

Мы показали, что сверхэкспрессия неактивной формы протеинкиназы GSK3 в различных кластерах дофаминергических нейронов может приводить к различным эффектам. Так, у самцов влияние на ПЖ оказывает уменьшение активности GSK3 в кластере *pal*, достоверно снижая ее. У девственных самок уменьшение активности GSK3 в кластере *ppm2* приводит к увеличению ПЖ, но этот эффект проявляется только в отсутствие сверхэкспрессии трансгена в других кластерах, что может говорить о разнонаправленном вкладе разных групп дофаминергических нейронов в контроль ПЖ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Наши исследования позволяют говорить о том, что изменение экспрессии отдельных генов и кодирующих их белков в отдельных тканях и клетках может вызывать противоположно направленные изменения ПЖ у особей разного пола. Механизмы специфичного влияния функциональных изменений в отдельных нейронах на ПЖ самцов и самок заслуживают дальнейшего изучения. Прогресс исследований в этой области может изменить подходы к терапии, призванной замедлить старение.

Работа проведена в рамках выполнения госзадания НИЦ «Курчатовский институт».

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РЕЗИДЕНТНЫХ ШТАММОВ В МИКРОБИОТЕ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

**Данилова О.А.¹, Сенина А.М.², Маркелова М.И.², Пономарева Е.Р.²,
Максимова К.А.² Синягина М.Н.², Хуснутдинова Д.Р.², Григорьева Т.В.²**

¹*Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия*

²*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Микробиота кишечника человека — сложная и адаптивная экосистема, обеспечивающая широкий спектр жизненно важных функций организма хозяина. Особый интерес представляют резидентные штаммы, формирующие функциональное ядро сообщества и обеспечивающие его

устойчивость [1]. Современные исследования микробиоты кишечника человека демонстрируют высокую динамику на уровне бактериальных штаммов и отдельных генетических вариантов [2], что имеет значение для персонализированной микробиомной терапии и мониторинга состояния здоровья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Проанализированы функциональные свойства бактериальных геномов, собранных из метагеномных прочтений (MAGs), полученных из фекальных образцов 10 здоровых добровольцев в трёх временных точках: старт, 2 недели и 1 год. ДНК выделяли с использованием MP FastDNA Spin Kit for Feces (MP Biomedicals, США), качество оценивали на агарозном геле и Qubit 2.0. Библиотеки готовили с помощью NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (NEB, США), секвенирование проводили на Illumina HiSeq 2500. После сборки и фильтрации MAGs выделены 62 стабильных штамма с ANI > 99,6 %, принадлежащие комменсальным видам (*Bacteroides uniformis*, *Escherichia coli* и др.).

Аннотирование MAGs выполнено в пакете microtrait (R): определены физиологические признаки, метаболические пути и гены устойчивости к стрессу. Выделено консервативное функциональное ядро (транспорт аминокислот, протеолиз, утилизация углеводов) и признаки нишевой специализации (транспорт ксилозы, желчных кислот и др.) у *E. coli*, *Akkermansia muciniphila* и др.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Метаболические профили показали преобладание хемоорганогетеротрофии: ферментация (до ацетата, КЖК), аэробное дыхание (ETC I/IV), анаэробное дыхание (фумарат). Пути денитрификации, сульфатредукции и метаногенеза в основном отсутствовали, кроме *Methanobrevibacter smithii*, что подтверждает анаэробные условия кишечника.

Гены стрессоустойчивости обнаружены во всех MAGs: тепловой шок, нейтрализация АФК, биоплёнки, адаптация к окислительному стрессу. Большинство штаммов — мезофилы (Topt 35–40 °C), но у *Prevotella copri* и ряда

Proteobacteria отмечены признаки умеренной термофилии ($T_{opt} > 44\text{ }^{\circ}\text{C}$), отражающие толерантность к воспалению. Время удвоения варьирует от $<0,2$ ч до ~ 4 ч, что отражает стратегию от быстрорастущих *r*- до медленных *K*-штаммов.

ВЫВОДЫ: Таким образом, резидентные штаммы микробиоты кишечника человека демонстрируют не только консервативные черты, но и значительную функциональную пластичность, отражающую разнообразие ниш и стратегий выживания в кишечной среде.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Работа выполнена в рамках проекта № FZSM-2023-0013 государственного задания КФУ.

КОНСТРУИРОВАНИЕ БЕЗМАРКЕРНОГО ШТАММА *KOMAGATAELLA PHAFFII* ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ КУТИНАЗЫ APNCUT1 ИЗ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *AUREOBASIDIUM PULLULANS* ВКМ 1116

**Ф.К. Ермилов¹, Е.В. Журишкина¹, Е.В. Энейская¹, А.А. Кульминская¹,
И.А. Сизова¹**

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

Кутиназы (К.Ф. 3.1.1.74) - ферменты, способные гидролизовать сложноэфирные связи природных и синтетических полимеров. Основным природным субстратом является кутин - алифатический полиэфир, формирующий защитный слой растений. Ферменты данного класса применяются в различных областях промышленности, в том числе для утилизации синтетических пластиков, таких как поликапролактон (ПКЛ) - биоразлагаемый аналог традиционных пластмасс, загрязнения которыми увеличивается с каждым годом. Создание эффективного ферментного препарата на основе кутиназ является перспективной задачей в современном мире.

Скрининг продуцентов кутиназ проводили среди мицелиальных грибов из коллекции ПИЯФ. Выявлен штамм *Aureobasidium pullulans* ВКМ 1116, способный деградировать ПКЛ. Секвенирование участков его генома позволило идентифицировать ген *ApnCUT1*, кодирующий белок с высокой степенью идентичности с аннотированной кутиназой из *A. pullulans* variant *namibiae* (NCBI: XP_013423757.1; 96%,). Выравнивание аминокислотных последовательностей с высокоактивной кутиназой *CLE1* из *Cryptococcus* sp. выявило аминокислотные замены, потенциально повышающие активность фермента, которые были внесены в кодирующую последовательность гена *ApnCUT1* для получения генов с необходимыми мутациями.

Гены дикого типа и мутантных вариантов *ApnCUT1* клонировали в интеграционные векторы и экспрессировали в клетках *Komagataella phaffii*. Путем скрининга многокопийных клонов на агаризованной среде с высоким содержанием зеоцина (1000 мкг/мл) получили клетки эффективно секретирующие кутиназы. Биохимическую активность препаратов фермента оценивали с использованием модельного субстрата 4-нитрофенил (16-метилсульфоновый эфир) гексадеканоата (pNMSEH) и поликапролактона. Обнаружено, что одна из аминокислотных замен (*Mut1*) повышает эффективность гидролиза pNMSEH в 1,8 раза и существенно стимулирует скорость гидролиза ПКЛ. Для повышения экологической безопасности в области биотехнологии и стабильности штаммов важно использовать продуценты без маркеров устойчивости к антибиотикам. Безмаркерные продуценты кутиназ были получены с использованием экспрессионных кассет, содержащих маркер прототрофности *HIS4*. Отбор многокопийных клонов провели с использованием репортерной системы на основе субстрата флуоресцеин-бутирата. В результате работы получены штаммы-продуценты *ApnCUT1* и *ApnCUT1- Mut1*, обладающие способностью к деградации ПКЛ, что открывает перспективы их применения в экологически эффективных технологиях утилизации пластика.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА КЛЕТОК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЯИЧНИКОВ КРЫС, ПЕРЕНЕСШИХ ПРЕНАТАЛЬНЫЙ СТРЕСС

Есалиева М.С, Курьянова Е.В.

*Кафедра фундаментальной биологии, Астраханский государственный
университет им. В.Н. Татищева, Астрахань, Россия*

АКТУАЛЬНОСТЬ РАБОТЫ: Вопрос о воздействии пренатального стресса на формирование организма, его органов и систем является предметом пристального внимания исследователей в последние десятилетия (Полякова, 1999; Вьюшина и соавт., 2020, 2021, 2024; Кулешова и соавт., 2021, 2024). Крысы являются отличной моделью для исследования влияния пренатального стресса ввиду хорошо изученных механизмов стрессовой реакции и особенностей репродукции. Учитывая это, для проведения нашей исследовательской работы мы выбрали этих животных (Полякова, 1999). Во время беременности влияние стресса становится особенно критичным, поскольку он может иметь долгосрочные последствия для потомства, включая предрасположенность к нервно-психическим и поведенческим расстройствам (Полякова, 1999; Вьюшина и соавт., 2020, 2021, 2024). Исследования показывают, что пренатальный стресс может приводить к нарушениям в развитии различных систем организма, включая эндокринную и репродуктивную. В частности, щитовидная железа и яичники чувствительны к воздействию пренатального стресса (Кулешова и соавт., 2024). Дисфункция эндокринных желез может быть связана с повреждениями генетического аппарата клеток, однако механизмы повреждения ДНК требуют дальнейшего изучения.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ. Таким образом, цель данного исследования - оценить влияние пренатального стресса на фоновый и индуцированный свободными радикалами уровень повреждений ДНК в клетках щитовидной железы и яичников старых самок крыс.

МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ: клетки щитовидных желёз и

яичников старых самок нелинейных белых крыс (22-24 месяца). Половина животных ($n=8$) составила контрольную группу (далее - Контроль), эти крысы были интактными, то есть никаким воздействиям не подвергались. Другая половина крыс ($n=8$) образовала группу Пренатальный стресс (далее - Стресс), эти крысы перенесли так называемый пренатальный стресс, поскольку их матери с 16 по 19 день беременности подвергались эмоциональному стрессу.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ: методика выявления ДНК-комет. Общая процедура метода включает подготовку гель-слайдов (предметных стекол, покрытых тонким слоем универсальной агарозы), получение микропрепаратов, лизис клеток, щелочную денатурацию, электрофорез, окрашивание и микроскопический анализ. После реализации выше описанной методики и получения готовых препаратов, мы изучали их под флуоресцентным микроскопом Axio Scope.A1 («ZEISS», Германия), совмещённом с цифровой камерой высокого разрешения (Axioscam 208 color, «ZEISS», Германия), при увеличении $\times 400$. Изображения ядер и ДНК-комет изучали и измеряли с использованием программного обеспечения ZEN 3.0. На полученных фотографиях подсчитывали число четко видимых биологических объектов - ядер клеток, которые идентифицировали по правильной округлой форме, четкой и стабильной флуоресценции. Измеряли диаметр ядер, подсчитывали число встречающихся на препаратах ДНК-комет и измеряли длину их хвостов. Рассчитывали процент встречаемости ДНК-комет на препаратах, средний диаметр ядер клеток щитовидных желез и яичников, строили вариационные ряды, находили средние величины длины хвостов ДНК-комет, проводили межгрупповые сравнения по критерию Стьюдента для независимых выборок, используя возможности программ Microsoft Excel и Statistica 10.0.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ:

1. Влияние пренатального стресса на размеры ядер клеток:

У пренатально стрессированных крыс обнаружено достоверное уменьшение размеров ядер клеток щитовидной железы (в среднем с 12,6 до 7,4 мкм), что может свидетельствовать о гипотрофии и снижении функциональной

активности железы.

Размеры ядер клеток яичников под влиянием пренатального стресса существенно не изменились.

2. Уровень повреждений ДНК в клетках щитовидной железы:

У интактных крыс фоновый уровень повреждений ДНК в клетках крайне низок (5%), а инкубация с перекисью водорода не привела к увеличению числа ДНК-комет.

У пренатально стрессированных крыс доля клеток с повреждениями ДНК в щитовидной железе увеличилась в 12 раз (до 20,5%), однако индукция окислительного стресса не усугубила повреждения.

3. Уровень повреждений ДНК в клетках яичников:

В контрольной группе фоновый уровень повреждений составил 8,6%, а при инкубации с H_2O_2 доля ДНК-комет возросла до 30,9%. У пренатально стрессированных крыс фоновый уровень повреждений достиг 48,7%, а при окислительном стрессе — 50%, что свидетельствует о повышенной уязвимости ДНК клеток яичников.

4. Сравнительная устойчивость тканей к окислительному стрессу:

Клетки щитовидной железы проявили высокую устойчивость к индуцированному окислительному стрессу как в контрольной, так и в стрессированной группе.

Клетки яичников оказались значительно более чувствительными к действию свободных радикалов, особенно на фоне пренатального стресса.

5. Длина хвостов ДНК-комет как показатель тяжести повреждений:

Наибольшая длина хвостов комет зафиксирована в клетках щитовидной железы пренатально стрессированных крыс (до 32,1 мкм), что указывает на высокую степень фрагментации ДНК.

В яичниках длина хвостов комет была стабильной и не увеличивалась под влиянием H_2O_2 , что может свидетельствовать об ином механизме ответа на стресс, то есть не усугубляет повреждение генетического аппарата клеток яичников.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ:

1. Метод ДНК-комет является высокоэффективным инструментом для оценки генотоксичности. Метод продемонстрировал высокую чувствительность и универсальность, позволив выявить тканеспецифические различия в повреждении ДНК на уровне отдельных клеток щитовидной железы и яичников.

2. Пренатальный стресс является мощным фактором, индуцирующим долгосрочные повреждения ДНК. У пренатально стрессированных старых крыс количество клеток с повреждениями ДНК в щитовидной железе было в **12 раз выше**, а в яичниках — в **2,3 раза выше**, чем в контроле. Это свидетельствует о стойком нарушении целостности генома под влиянием стресса, проявляющемся даже в старческом возрасте.

3. Выявлена тканеспецифическая чувствительность к стрессу: яичники более уязвимы, чем щитовидная железа. Наибольшее абсолютное число клеток с повреждениями ДНК зафиксировано в ткани яичников пренатально стрессированных крыс (до 50%). Это указывает на то, что репродуктивная система является критической мишенью для пренатального стресса.

4. Клетки щитовидной железы демонстрируют высокую устойчивость к окислительному стрессу. Инкубация с перекисью водорода не привела к увеличению числа ДНК-комет в тироцитах, в отличие от клеток яичников. Это говорит о более эффективной системе антиоксидантной защиты и репарации ДНК в щитовидной железе.

5. Пренатальный стресс влияет на морфологию клеток. Обнаружено достоверное уменьшение размеров ядер тироцитов у стрессированных животных, что может свидетельствовать о гипотрофии и снижении функциональной активности щитовидной железы. Аналогичных изменений в яичниках не выявлено.

6. Повреждения ДНК в условиях стресса связаны с окислительным стрессом и нарушением репарации. Увеличение количества ДНК-комет у

стрессированных животных объясняется усилением генерации активных форм кислорода (например, гидроксильного радикала) и, вероятно, подавлением механизмов восстановления ДНК.

ВЫВОДЫ:

1. На препаратах клеток щитовидных желез и яичников стареющих самок крыс чаще обнаруживаются ядра размерном диапазоне 5-10 мкм, средние значения диаметра ядер колеблются около 7 мкм. Пренатальное стрессирование способствует снижению диаметра ядер тироцитов, но не отражается на размерах ядер клеток яичников. Активация свободнорадикального окисления в среде инкубации приводит к некоторому увеличению размеров ядер клеток яичников.

2. У intactных крыс в фоновых условиях большее количество ДНК комет обнаруживается в ткани яичников, крайне мало – в щитовидных железах. У пренатально стрессированных самок частота встречаемости ДНК-комет резко увеличена как в ткани щитовидной железы (в 12 раз), так и в ткани яичников (в 2,3 раза). Наибольшее абсолютное число ДНК-комет фиксируется в ткани яичников пренатально стрессированных самок крыс.

3. В условиях индукции свободно-радикального окисления наибольший прирост числа ДНК-комет характерен для ткани яичников как intactных, так и пренатально стрессированных крыс. Прирост числа ДНК-комет в препаратах из щитовидных желез крыс обеих серий не фиксируется, длина хвостов комет не увеличивается, следовательно, ДНК тироцитов в целом менее подвержена повреждениям свободными радикалами.

4. Пренатальное стрессирование потенцирует возникновение повреждений ДНК в клетках щитовидных желез и, особенно, яичников в ходе онтогенеза самок крыс. Для клеток щитовидных желез в большей мере, чем для клеток яичников, характерна устойчивость к индукции повреждений ДНК свободными радикалами, что проявляется на фоне пренатального стрессирования.

IN SILICO ПОИСК И АНАЛИЗ РАЗНООБРАЗИЯ СТРУКТУР CRISPR-CAS-СИСТЕМ В ГЕНОМАХ ПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ CLOSTRIDIUM BOTULINUM С ЦЕЛЮ РАЗРАБОТКИ ТАРГЕТНЫХ ФАГОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

**Кахиани К.Б.¹, Джигоев Ю.П.¹, Тетерина Г.А.², Арефьева Н.А.^{2,3,4},
Борисенко А.Ю.¹, Букин Ю.С.^{2,5}**

¹*Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Россия*

²*Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия*

³*Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск,
Россия*

⁴*Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и
Дальнего Востока, Иркутск, Россия*

⁵*Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Проблема антибиотикорезистентности патогенных штаммов *Clostridium botulinum* сохраняет высокую актуальность в инфекционной медицине. В качестве перспективного направления рассматривается создание таргетных фаговых препаратов, нацеленных на возбудителя ботулизма. Цель работы — биоинформационный анализ разнообразия CRISPR-Cas-систем в геномах штаммов *C. botulinum* и идентификация фагов, с которыми бактерия взаимодействует в природных условиях и приобрела устойчивость.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Объектом исследования стали 49 полных геномов *C. botulinum* из базы данных GenBank. Cas-гены определяли с помощью *in silico* программ MacSyFinder на основе профилей PFAM и TIGRFAM. Структуру CRISPR-кассет анализировали в программах CRISPRFinder, PILER-CR и CRISPR Recognition Tool. Поиск протоспейсеров выполняли через CRISPRTarget и BLASTn по базе RefSeq-Viral.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Во всех исследованных геномах обнаружены CRISPR-Cas-системы классов I-B, III-A, III-B и III-D. Идентифицировано 204 протоспейсера, для 33 из которых найдены фаговые

гомологи. Наибольшее представительство имели фаги родов *Cellulophaga* (19%), *Aeromonas* и *Bacillus* (12,5%), что отражает экологическое разнообразие взаимодействий *C. botulinum*. Установлено, что CRISPR-Cas-репертуар формируется под влиянием широкого спектра фагов, включая условно-патогенные и симбиотические бактерии кишечника.

ВЫВОДЫ: Бактерия *C. botulinum* обладает сложной системой CRISPR-Cas систем, отражающей адаптацию к разнообразным экологическим нишам. Проведённый анализ позволяет исключить фаги, к которым данные исследуемые штаммы приобрели устойчивость. Потенциальными кандидатами для разработки таргетных фаговых препаратов против *C. botulinum* могут стать не выявленные через их CRISPR-кассеты фаги.

EFFECTS OF VALPROIC ACID ON BEHAVIOR IN ZEBRAFISH MODELS OF CHRONIC STRESS

Kozlova E., Jiale Chu, Yingze Wang, Gaomuyi Wang, Meitong Zhou, Xuesong Xie, Yufei Bai, Jiahao Cui, Longen Yang, Kalueff A.V.

Xi'an Jiatong-Liverpool University, Suzhou, China

BACKGROUND: Valproic acid (VPA), a short-chain fatty acid with a branched structure, is synthesized from naturally occurring valeric acid. It was initially introduced as a treatment for childhood epilepsy but is also used for seizures, migraine, bipolar disorder, and anxiety. Recent works explored VPA's potential as an adjunctive treatment in oncology, HIV management, and neurodegenerative disorders due to its HDAC-inhibiting properties. However, the drug's effects on the behavior remain unclear, yet are essential for determining its clinical applications.

OBJECTIVE: The aim of this study is to investigate the effects of valproic acid on the behavior of adult zebrafish under normal and chronic stress conditions.

METHODS: Chronic stress model in adult zebrafish was induced through exposure to multiple stressors, including noise and vibration, social isolation, tank shaking, long-term movement restriction, and stimulation of predator exposure. The

fish were subjected to a rotating combination of these stressors daily over a period of one month until they exhibited consistent behavioral and physiological signs of chronic stress.

Zebrafish were divided into four experimental groups: (1) control, (2) control with VPA (valproic acid), (3) chronic stress, and (4) chronic stress and VPA. The effects of both drug treatment and chronic stress exposure were assessed using behavioral tests, such as the novel tank test (NTT), light-dark box test (LDB), and shoaling test.

RESULTS: In behavioral assessments, chronic stress zebrafish with VPA treatment (4) exhibited significantly increased time spent in the light compartment of the light-dark box (LDB) compared to stressed fish without VPA (3). Similarly, in the novel tank test (NTT), the chronic stress with VPA group (4) showed greater preference for the upper half of the tank relative to the stress-only group.

Comparative analysis revealed that both VPA-treated groups (control with VPA (2) and stress with VPA (4)) and untreated controls (1, 3) demonstrated: increased light zone preference in LDB and enhanced top-dwelling behavior in NTT.

The shoaling test demonstrated significant differences in inter-fish distance between groups. Zebrafish treated with VPA (2, 4) maintained greater average distances from each other compared to the chronic stress-only group (3). However, both VPA-treated groups (2, 4) still exhibited closer proximity than untreated controls (1).

CONCLUSIONS: Valproic acid (VPA) treatment did not impair zebrafish social behavior, but rather appeared to partially mitigate stress-induced social withdrawal. Furthermore, VPA administration was associated with reduced anxiety-like behavior and increased exploratory activity in both stressed and non-stressed fish.

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ В ОТВЕТ НА ИЗМЕНЯЮЩИЕСЯ УСЛОВИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Мартюшова В.Г.^{1,2}, Кондрашов Б.С.^{1,2}, Донцова К.А.¹,

Пчелинцев М.И.³, Седых С.Е.^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

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

*³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.
Сеченова Минздрава России*

ВВЕДЕНИЕ: Актуальность изменения уровня экспрессии ключевых генов, кодирующих ферменты метаболических путей у сельскохозяйственных растений, а также метилирования кодирующих и некодирующих последовательностей ДНК имеет несомненную актуальность для решения задач повышения продуктивности сельскохозяйственных культур в условиях изменяющегося климата и обеспечения продовольственной безопасности. Анализ изменения уровня экспрессии генов и паттернов метилирования позволят выявить молекулярно-генетические маркеры, ассоциированные с благоприятными для урожайности признаками, что является фундаментальной основой для оценки влияния различных факторов, в том числе, удобрений на рост и развитие растений в разных условиях. Целью исследования является оценка различных подходов к анализу изменения уровня экспрессии генов растений методами полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени и нанопорового секвенирования с предварительной обработкой метилзависимыми эндонуклеазами рестрикции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: В данной работе использовали несколько бактериальных культур *Pseudomonas fluorescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus megaterium*, обладающих способностью азотфиксации и проявляющих другие благоприятные для роста и развития растений свойства, а также растения

гороха, подсолнечника и кукурузы. Влияние бактерий на рост и развитие сельскохозяйственных культур изучали с помощью ПЦР с обратной транскрипцией и последующей обработкой данных методом $\Delta\Delta C_t$, проводили анализ изменения уровня экспрессии генов *rbcS*, *PEPC1*, *ME*, продукты которых принимают участие в основных метаболических путях растений, а также анализировали данные морфометрии растений. Также проводили анализ различий метилирования ДНК растений, обработанных бактериями, в контрольных и экспериментальных образцах с помощью метилзависимых эндонуклеаз рестрикции и секвенирования на платформе MinION (Oxford Nanopore Technologies).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Выраженное положительное влияние на рост кукурузы оказала культура *P. fluorescens*, которая приводила к увеличению длины побега на 77,9% по сравнению с контролем. На уровень экспрессии генов *rbcS*, *PEPC1* в листе кукурузы положительное влияние оказали *P. fluorescens* и *B. megaterium*. Статистически значимое положительное влияние на рост гороха оказала инокуляция культурой *B. megaterium*, которая приводила к увеличению длины побега в 3,3 раза. В листьях проростков данного сорта на экспрессию гена *rbcS* положительное влияние оказало внесение культуры *P. fluorescens*. Было показано, что все культуры бактерий оказывают положительное влияние на экспрессию генов *rbcS*, *PEPC1* в листе подсолнечника. При этом в образцах, инокулированных *S. maltophilia*, изменение уровня экспрессии обоих генов значительно выше по сравнению с контролем.

В результате нанопорового секвенирования установлено, что обработка сельскохозяйственных культур бактериальными штаммами приводит к изменению паттернов метилирования в промоторных областях исследуемых генов у кукурузы и гороха.

ВЫВОДЫ: Использование ОТ-ПЦР-РВ и нанопорового секвенирования позволяет оценить эффект внесения почвенных бактерий и определить гены, уровень экспрессии которых значимо изменяется по сравнению с контролем. Оба метода выявили четкую корреляцию между инокуляцией бактериями,

благоприятно влияющими на рост и развитие растений и активацией экспрессии ключевых метаболических генов у сельскохозяйственных культур.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: исследование поддержано Министерством науки и высшего образования РФ (Соглашение No. 075-15-2021-1085).

АНАЛИЗ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ И РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ВИРУСОВ КАРТОФЕЛЯ В АГРОЦЕНОЗАХ ПЕРМСКОГО КРАЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР-РВ

Печенкина В.А.^{1,2}, Наговицына В.О.², Лисина Т.Н.¹

¹Лаборатория агробιοфотоники, ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

²Биологический факультет, ПГНИУ, Пермь, Россия

Картофель является одной из важнейших продовольственных культур в России и Пермском крае, где отмечается устойчивое снижение урожайности. Значительный урон картофелеводству наносят вирусные инфекции: потери более 50% урожая. Фитосанитарный мониторинг в регионе проводится фрагментарно, что обуславливает необходимость масштабного исследования вирусной зараженности.

Цель работы – выявление зараженности вирусами PLRV, Y, X, A, S, M сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.), выращиваемых в 10 районах Пермского края.

Исследование проведено на 6 сортах картофеля (Ирбитский, Легенда, Невский, Люкс, Аляска, Шах), собранных в 10 районах Пермского края. Проанализировано 120 образцов листьев картофеля, отобранных в начале вегетационного периода. Выделение тотальной РНК выполняли модифицированным СТАВ-методом с использованием PVPP. Качество препаратов РНК контролировали на спектрофотометре NanoDrop 2000. Детекцию вирусов проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени на

амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) с коммерческими наборами реагентов ("Синтол"). Анализ данных осуществляли с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager.

Общее количество зараженных проб картофеля в Пермском крае составило 68 (19% от исследованных проб). Наиболее пораженные регионы: Барда (30,5% зараженных образцов), Гайны, Нытва, Большая Соснова (22%). Наиболее уязвимые сорта картофеля: Ирбитский (в 25% было обнаружено инфицирование вирусом), Люкс и Легенда (20%), Аляска и Невский (17%). По вирусному заражению преобладает вирус М (в 58% проб было обнаружено заражение), вирусы Y (32%) и S (20%) также широко распространены, вирусы L и A не обнаружены. Прослеживаются некоторые сорт-вирусные связи: вирус М порастил все исследуемые сорта, вирус Y чаще встретился у сортов Аляска, Невский, Люкс, вирус S чаще обнаружился у сортов Легенда, Ирбитский, Шах. Необходимы дальнейшие исследования.

Выявлено значительное распространение вирусных инфекций картофеля в Пермском крае, особенно в районах Барда, Гайны, Нытва и Большая Соснова. Наибольшую угрозу представляют вирусы М и Y, поразившие широкий спектр сортов. Сорта Ирбитский, Люкс и Легенда оказались уязвимыми и требуют повышенного внимания при защите от вирусных заболеваний. Рекомендуется усилить мониторинг и внедрить фитосанитарные мероприятия в наиболее пораженных районах.

*Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки
Российской Федерации в рамках Государственного задания, номер
государственной регистрации НИОКТР 122031100058-3.*

**ИЗУЧЕНИЕ ВКЛАДА ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА ГЕНА
ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NFκB В РАЗВИТИЕ
ЮВЕНИЛЬНОГО ИДИОПАТИЧЕСКОГО АРТРИТА.**

Осипова А. С., Галимова Э. М.

*Естественно-географический факультет, БГПУ им. М. Акмуллы, Уфа,
Республика Башкортостан, Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Актуальность работы: Полиморфизм гена NFκB при ювенильном идиопатическом артрите (ЮИА) обусловлен ролью этого фактора в запуске воспаления. Поскольку причины ЮИА неизвестны, выявление конкретных генетических вариантов, позволит раскрыть механизмы ее развития, найти маркеры и определить новые мишени для терапии.

ЦЕЛЬ: обнаружить взаимосвязь гена NFκB1 у больных людей с ассоциацией по тяжести заболевания ювенильного идиопатического артрита.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Молекулярные (Выделение ДНК; ПЦР-анализ; ПДРФ-анализ; Электрофорез в агарозном геле.

Статистические (Проверка на равновесность с помощью уравнения Харди-Вайнберга; Критерий χ^2 с поправкой Йетса.

Биоинформатические (NCBI; UniProt; Моделирование структуры белков:Swiss model).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Полученные результаты свидетельствуют, что генотип DD полиморфизма гена NFκB1 является генетическим маркером риска развития тяжелой формы ЮИА и ассоциирован с системным воспалительным ответом (повышение СОЭ). Напротив, генотип II, по-видимому, оказывает протективный эффект, коррелируя с более легким течением болезни.

ВЫВОДЫ: У больных с тяжелым течением ЮИА выявлены высокие показатели маркеров воспаления, так СОЭ повышен у 88,3%, СРБ повышен у 89,3%.

Выявлено повышение частоты генотипа DD при тяжелом течении (23,6%

против 12,1 %). Генотип II чаще встречается при легком течении заболевания (40,7 против 28,5%).

У больных с повышенным содержанием СОЭ выявлено повышение частоты генотипа DD при нормальном содержании (20,5% против 11,3%). Генотип II в группе с высоким уровнем СОЭ снижен (33,2% против 35,8%). Выявлено незначительное увеличение частоты генотипа II при высоком уровне СРБ (28,3% против 33,9%).

Выявлено незначительное увеличение частоты генотипа II при высоком уровне IgA (31,6% против 33,9%). Генотип DD в группе с высоким уровнем IgA снижен (18,6% против 15,3%). У больных с высоким уровнем IgM выявлено незначительное снижение частоты генотипа II (33,8% против 30,3%). Генотип DD в группе с высоким уровнем IgM повышен (15,8% против 18,2%). Выявлено незначительное увеличение частоты генотипа DD при высоком уровне IgG (15,2% против 17,6%). Генотип II в группе с нормальным содержанием уровня IgG понижен (33,9% против 31,6%).

СОЗДАНИЕ IN SILICO БИБЛИОТЕКИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОМОТОРОВ ДЛЯ ТОНКОЙ РЕГУЛЯЦИИ *GUM*-ОПЕРОНА У *XANTHOMONAS CAMPESTRIS*

Панькина К.Ю.

*Кафедра общей генетики, генной инженерии и биоинженерии, факультет
биотехнологии и биологии, ФГБОУ ВО «НИ МГУ им. Н.П. Огарёва», Саранск,
Республика Мордовия, Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Промоторы являются ключевыми генетическими элементами для контроля экспрессии генов. Однако промоторы *gum*-оперона, ответственного за синтез биотехнологически ценного экзополисахарида ксантана, часто не позволяют осуществлять прецизионную регуляцию его продуктивности. Отсутствие набора стандартизированных промоторов с

предсказуемой и градиентной силой является «узким местом» в метаболической инженерии штаммов-продуцентов. **Цель работы** – разработать синтетические промоторы (*in silico*) с заданной силой для тонкой настройки экспрессии *gum*-оперона и оптимизации биосинтеза ксантана. Предложенный подход позволяет перейти от эмпирического скрининга штаммов к целенаправленному конструированию метаболических путей. Использование элементов библиотеки открывает возможность не только количественного управления уровнем синтеза ксантана, но и тонкого влияния на его молекулярно-массовые характеристики и реологические свойства через дифференциальную регуляцию генов *gum*-оперона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: В работе использовались методы биоинформатики: множественное выравнивание последовательностей (BLAST, UGENE), предсказание силы промотора (алгоритмы на основе Position Weight Matrix, BPROM (Softberry)), молекулярное моделирование ДНК-белковых взаимодействий. Дизайн промоторов осуществлялся с использованием специализированного ПО (SnapGene).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: В ходе работы была успешно создана *in silico* библиотека синтетических промоторов для регуляции *gum*-оперона *Xanthomonas campestris*. Библиотека включает набор варибельных генетических элементов, разработанных на основе рационального дизайна. Проведенный биоинформатический анализ позволил идентифицировать и охарактеризовать ключевые регуляторные элементы нативных промоторных регионов *gum*-оперона. На этой основе были сконструированы синтетические промоторные последовательности, демонстрирующие прогнозируемый широкий динамический диапазон активности – от существенно ослабленных до высокоактивных вариантов. Для валидации подхода было проведено молекулярное моделирование, показавшее варибельность в энергии связывания синтетических промоторов с основным фактором транскрипции, что подтверждает теоретическую обоснованность предложенного дизайна и предполагаемую градацию их силы. Полученные результаты демонстрируют

эффективность подхода компьютерного дизайна для создания стандартизированных генетических элементов с заданными свойствами.

ЛАБОРАТОРИЯ НА ЖЕСТКОМ ДИСКЕ, ИЛИ КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ АРХИТЕКТУР ИИ-МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ПОМОЩИ В ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ

Пермяков С.С.

Технологический факультет, ФГБОУ ВО «ВГУИТ», Воронеж, Россия

АННОТАЦИЯ: В работе представлен общий анализ архитектур искусственного интеллекта, с детальным разбором передовой модели CRISPR-GPT. Определены ключевые преимущества и векторы развития, а также проведена экспериментальная оценка модели «в живую». Рассмотрены вопросы актуальности и востребованности *in silico* моделей в генетических исследованиях. Выполнена работы по структуризации и преобразованию сложной темы в легкую для восприятия форму.

ВВЕДЕНИЕ: Геномное редактирование – наиболее быстро развивающийся метод биологического исследования и модификации живых структур для практического применения. Широта применения и относительная простота притягивает внимание не только независимых исследователей, но и крупных агро- и фарма- компаний. Однако вариативность результатов редактирования в разных типах клеток и побочные эффекты редактирования остаются серьезными проблемами, замедляя внедрение идей в жизнь. Решение этой задачи нашли биоинформатики, применяя искусственный интеллект (ИИ), для предсказания реакций на изменения, основываясь на больших базах данных предыдущих экспериментов. Постараемся показать, насколько быстро развиваются экспериментальные генетические модели *in silico* и как они могут помогать в исследованиях уже сейчас.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Проведен аналитический обзор

современных ИИ-моделей, включающих большие языковые модели (LLM), такие как CRISPR-GPT, Evo, и другие генеративных архитектуры. Рассмотрены предыдущие исследования в предсказании структуры белков. Проведен эксперимент с интегрированием ИИ в работу действующей лаборатории.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Аналитический обзор open-source моделей, доступных к изучению показал логарифмический рост эффективности моделей ИИ. Не смотря на замедление, новизна этой технологии в контексте генетической лаборатории позволяет увидеть больше места для улучшений, что и показали создатели CRISPR-GPT. Также, тестирование модели в полевых условиях действительно доказало полезность и перспективность ИИ моделей.

ВЫВОДЫ: Несмотря на скептическое отношение к ИИ и явное замедление роста эффективности моделей от количества данных для обучения можно сказать, что генеративные и языковые вариации этой технологии могут стать путем к ускорению процессов разработки.

ЛИНИЯ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩАЯ CD44-GFP, ДЛЯ МОНИТОРИНГА ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Сёмчина А. А., Рыжкова А. Ю., Першина А. Г.

*Центр биологических исследований и биоинженерии ЦНИЛ СибГМУ, Томск,
Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Образование вторичных опухолей (метастазов) – основная причина высокой летальности многих видов раковых заболеваний. Согласно современным представлениям, для того чтобы инициировать рост метастаза, диссеминированная раковая клетка во вторичном очаге должна перейти в состояние, подобное стволовой клетке, в результате дедифференцировки. Одним из маркеров такого перехода является экспрессия поверхностного маркера CD44.

Целью исследования было создать линию клеток рака молочной железы

человека T47D, транскрибирующих продукт гена CD44 в виде единой мРНК с зеленым флуоресцентным белком (eGFP) и транслирующих CD44 и eGFP в форме отдельных белков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Для получения генетически модифицированной линии клеток была использована система CRISPR/Cas9. Донорная плазмида была сконструирована С. П. Медведевым (ИЦИГ СО РАН, Новосибирск) и содержала последовательность, кодирующую зеленый флуоресцентный белок eGFP, ограниченную плечами гомологии к гену CD44, последовательность T2A-пептида между левым плечом гомологии и геном eGFP, ген устойчивости к антибиотику Neor/Kanr, ограниченный с двух сторон lox-сайтами; sgRNA были подобраны к 18 экзону гена CD44. Трансфекция клеток T47D была выполнена с использованием Metafectene (Biotex, Германия). Эффективность трансфекции оценивали методом проточной цитометрии. После селекции клеток и отбора клонов, устойчивых к генетицину, встраивание трансгена подтверждали методом ПЦР.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Эффективность ко-трансфекции клеток T47D, согласно данным проточной цитометрии, составила $4,30 \% \pm 0,06 \%$. С помощью ПЦР было подтверждено успешное встраивание трансгена. Методом предельных разведений была получена моноклональная линия клеток T47D_CD44_GFP. Согласно данным проточной цитометрии клеток T47D_CD44_GFP, окрашенных антителами PE anti-human CD44 (Biolegend), подтверждено, что GFP⁺ клетки экспрессируют CD44.

ВЫВОДЫ: Получена генетически модифицированная линия клеток рака молочной железы человека T47D_CD44_GFP, позволяющая идентифицировать CD44⁺ клетки за счет регистрации флуоресценции белка eGFP.. Полученная линия клеток предназначена для тестирования препаратов, подавляющих дедифференцировку раковых клеток. Преимущество использования подобных клеток при тестировании заключается в том, что процесс детектирования и подсчета флуоресцентных клеток может быть автоматизирован, использованием алгоритмов машинного обучения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Исследование выполнено в рамках программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030».

ВЫБОР ЭФФЕКТИВНЫХ АПТАМЕРОВ К БЕЛКОВЫМ МИШЕНЯМ

Сулима А.О., Ивко В.Л., Копылов А.М.

Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ: Аптамеры – синтетические короткие одноцепочечные олигонуклеотиды, способные специфично и высокоаффинно связываться с определенными мишенями. Поскольку потенциально аптамеры могут быть использованы для детекции молекулярных мишеней *in vivo*, существует необходимость оценивать аффинность аптамера к мишени в сложных смесях. Поэтому цели работы заключаются в оценке аффинности конкурирующих аптамеров к тромбину, а также в анализе аффинности в присутствии белка крови - альбумина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: В работе использованы G-квадруплексные ДНК-аптамеры к тромбину 15ТВА и RE31 с разной аффинностью. Аффинность анализировали методом интерферометрии биослоёв при иммобилизации аптамера на поверхности биосенсора. В конкурентных экспериментах в раствор к тромбину добавляли различные концентрации альбумина или ДНК-аптамер.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Получены кривые связывания для систем с белком-конкурентом: 15ТВА-тромбин, а также три системы с 1-, 10- и 100-кратным избытком БСА по отношению к тромбину. 100-кратный избыток БСА в системе приводит к значительному увеличению амплитуды кривых и на стадии ассоциации, и на стадии диссоциации комплекса 15ТВА-тромбин, несмотря на близкие значения кажущихся констант диссоциации. Получены кривые связывания для систем с конкурентным аптамером: 1) иммобилизованный 15ТВА+тромбин, 2) иммобилизованный 15ТВА+тромбин+RE31 в эквимольном количестве, 3) иммобилизованный

RE31+тромбин, 4) RE31+тромбин+15TBA в эквимольном количестве. Кривые показали большую аффинность RE31 в сравнении с 15TBA, что соответствует литературным данным (для 15TBA $K_D = 9,2 \pm 0,8$ нМ, для RE31 $K_D = 2,9 \pm 0,1$ нМ, DOI:10.1126.sciadv.ads9687). В системе с конкурентным аптамером RE31 наблюдается снижение амплитуды в 1,9 раз в сравнении с системой без конкурента, а в системе с конкурентным 15TBA - снижение в 1,4 раза.

ВЫВОДЫ: Метод интерферометрии биослоёв позволяет изучать аптамерные системы в присутствии конкурентных участников. Важно ориентироваться не только на рассчитанные значения констант, но и учитывать амплитуду и скорость изменения кинетических кривых ассоциации и диссоциации. Именно кинетический подход позволяет выбрать эффективный аптамер.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2024-561 от 24.04.2024 г.).

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА У КУРИЦЫ В УСЛОВИЯХ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА

Грушина В.А, Пинтус С.С.

Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия

Физиологическая адаптация птиц к экстремальным воздействиям, таким как холодовой стресс и вирусная инфекция, реализуется через сложные транскрипционные и эпигенетические механизмы, обеспечивающие баланс между метаболизмом и иммунным ответом. Настоящее исследование направлено на выявление молекулярных основ транскрипционной пластичности

у кур в условиях холодовой обработки и инфицирования вирусом гриппа А.

В анализ были включены данные RNA-seq трёх типов тканей русской белой курицы (хориоаллантаисная оболочка, печень и эмбрионы), а также CAGE-seq шести тканей F₂ поколения (русская белая × корниш). Сочетание транскриптомных подходов позволило охарактеризовать перестройки в экспрессии генов, связанных с метаболическими и иммунными процессами, и установить их пространственные связи в пределах топологически ассоциированных доменов (TAD).

Результаты исследования показали, что холодовая обработка приводит к подавлению метаболизма моносахаридов и гексоз, что, в свою очередь, влияет на активность ключевых метаболических путей, таких как гликолиз и пентозофосфатный путь. Это подавление может иметь значительные последствия для иммунного ответа, поскольку поглощение и метаболизм глюкозы критически важны для активации и функционирования иммунных клеток. Кроме того, было обнаружено, что у кур, подвергнутых холодовому стрессу и инфицированных гриппом, наблюдается снижение иммунного ответа. У эмбрионов наблюдалась высокая чувствительность к внешним воздействиям, проявлявшаяся в активации врождённого иммунного ответа и репрессии программ роста. Также результаты указывают на наличие половой специфики в регуляции транскрипции: у самцов активировались пути гликозилирования, у самок — апоптоз и воспаление. Интеграция данных CAGE и RNA-seq выявила 430 промоторных участков с признаками согласованной регуляции, включая участки, демонстрирующие переходы типа промотора (broad ↔ sharp) и активность энхансеров. В пределах TAD установлены регуляторные взаимодействия между TSS и энхансерами, опосредованные транскрипционными факторами GABPA, NR1D2, NR4A3 и FOSL2. Эти белки участвуют в регуляции циркадных ритмов, метаболизма и иммунного ответа, подтверждая связь транскрипционной пластичности с адаптационными процессами.

Полученные данные расширяют представления о пространственно-

эпигенетических механизмах регуляции транскрипции у птиц и демонстрируют, что архитектурная перестройка промоторов и активность энхансеров являются ключевыми компонентами адаптации к стрессовым факторам и инфекциям.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского
научного фонда (проект 24-24-20106, <https://rscf.ru/project/24-24-20106/>)*

ОПТИМИЗАЦИЯ МУЛЬТИФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ПСЕВДОВИРУСНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ SARS-COV-2

**Гулова С.М., Ершова А.Е., Павлова А.В., Ризатдинова С.Н., Шумеев А.Н.,
Недоспасов С.А., Астраханцева И.В.**

*Направление «Иммунобиология и биомедицина», Научный центр генетики и
наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная
территория «Сириус», Россия*

ВВЕДЕНИЕ: после окончания пандемии COVID-19, вирус SARS-CoV-2 продолжает циркулировать, являясь одним из возбудителей сезонных эпидемий ОРВИ. Для изучения особенностей формирования иммунитета на новые варианты вируса, необходим метод оценки способности адаптивного иммунитета нейтрализовать циркулирующие варианты вируса. Целью работы являлось создание теста, позволяющего оценивать уровень нейтрализации одновременно нескольких вариантов SARS-CoV-2, на основе псевдовирусной технологии, с флуоресцентной детекцией методом проточной цитометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: для одновременной оценки нейтрализации различных вариантов SARS-CoV-2 была использована трансдукция клеточной линии со сверхэкспрессией *hACE2* псевдовирусными частицами на основе лентивируса, которые нарабатывались в клетках HEK293T и были псевдотипированы различными вариантами S-белка SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1,

BA.1 и ХВВ.1.5) с соответствующей каждому варианту экспрессией флуоресцентного белка (mRuby3, mClover, mRhubarb713). Доля инфицированных клеток-мишеней определялась методом мультиканальной проточной цитометрии. Полученные результаты обрабатывали с помощью ПО FlowJo v10.10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: для сборки псевдовиральных частиц, типированных S-белком различных вариантов SARS-CoV-2 была подобрана панель плазмид, кодирующих флуоресцентные белки. С помощью проточной цитометрии было показано дифференцированное распознавание этих флуоресцентных белков в зараженных клетках. Отмечено, что при одновременном заражении клетки несколькими вариантами псевдовиральных частиц, интенсивность флуоресценции снижалась по сравнению с монофлуоресцентным контролем, что, однако, существенно не влияло на значение нейтрализации. С помощью разработанной системы была проанализирована динамика изменения нейтрализации изучаемых вариантов SARS-CoV-2 в образцах сывороток, полученных от доноров в период с 2021 по 2024 год. Было показано, что для образцов 2021 года была характерна нейтрализация варианта Wuhan-Hu-1, но не BA.1, в то время как в образцах, собранных в период с 2022 года, была выражена нейтрализация как Wuhan-Hu-1, так и BA.1 вариантов. Нейтрализация ХВВ.1.5 являлась наименьшей и присутствовала только в образцах, полученных после возникновения линии Omicron (2022 г.).

ВЫВОДЫ: предложенная мультифлуоресцентная клеточная псевдовиральная система эффективна для одновременной оценки нейтрализации трех вариантов SARS-CoV-2.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: работа выполнена при поддержке гранта
Российского научного фонда № 24-25-20139.

**MANAGING SYMBIOSIS SPECIFICITY OF *PISUM SATIVUM* L. WITH
RHIZOBIA VIA *PsLykX* GENE EDITING**

**Igor Yu. Zhuravlev¹, Andrew G. Matveenkov^{1,2}, Igor A. Tikhonovich^{1,2,3}
and Vladimir A. Zhukov^{1,3,4}**

¹ *Center for Genetics and Life Science, Sirius University of Science and
Technology, Sochi, Russia*

² *Faculty of Biology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

³ *All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology (ARRIAM), St.
Petersburg, Russia*

⁴ *N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St.
Petersburg, Russia*

Pea (*Pisum sativum* L.) establishes symbiosis with nitrogen-fixing rhizobia (*Rhizobium* sp.), selectively associating with compatible bacteria from the soil microbial community. The key gene in this process is *PsLykX*, encoding a receptor kinase that determines interaction specificity (Sulima et al., 2017). The *PsLykX^A* allele, identified in Afghan pea varieties, restricts symbiosis, enabling nodule formation only with bacteria carrying their *nodX* gene, whereas the European *PsLykX^E* allele permits symbiosis with a broader range of bacteria, including those lacking *nodX*.

The study aims to confirm the role of *PsLykX* in establishing legume-rhizobial symbiosis by editing its sequence and to evaluate potential control of specificity under field conditions. Using CRISPR/Cas9 technology, *Agrobacterium*-mediated transformation induced mutations in the *PsLykX* gene in the Cameor pea cultivar hairy root system. Transgenic root analysis revealed absence of nitrogen-fixing nodules upon

Field trials with the introgression line A33.18, homozygous for the afghan *PsLykX^A* allele in the European Rondo genetic background, showed dominant nodule formation (95%) by the inoculated TOM strain carrying *nodX*, while native soil strains rarely participated in symbiosis. The occasional presence of *nodX* in native strains suggests the *PsLykX^A* allele can enhance symbiotic efficiency by excluding less effective bacteria.

These results provide a basis for breeding new pea cultivars with targeted symbiotic interactions favoring highly efficient nodule-forming bacterial strains.

This project was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-10-2025-017 dated 27.02.2025).

IDENTIFICATION OF HYBRIDS AND SPATIAL GENETIC PATTERNS IN *RUBUS* VIA *rbcL* AND ITS BARCODING

**Igor Zhuravlev¹, Anton Korzhuk^{1,2}, Elena Tyurina¹, Elena Markova^{1,3},
Mikhail Menkov¹, Lilija Shipilina^{1,3}, Alexey Rozanov¹**

¹ *Plant Biology and Biotechnology Department, Sirius University of Science and
Technology, Sirius, Russia*

² *Laboratory of Molecular Biotechnology, The Institute of Cytology and Genetics, SB
RAS, Novosibirsk, Russia*

³ *N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg,
Russia*

Accurate species identification in blackberries (*Rubus* spp.) is challenging due to morphological similarity and frequent hybridization. Molecular methods like DNA barcoding provide tools to overcome these taxonomic difficulties, especially in complex plant groups. NA barcoding is a molecular identification method that uses short standardized genetic markers in the DNA to assign organisms to known taxa.

This study aimed to evaluate the effectiveness of multilocus DNA barcoding using plastid *rbcL* and nuclear ITS1 and ITS2 regions for species discrimination and detection of evolutionary processes in wild blackberry accessions from the Sirius Federal Territory along the Black Sea coast.

We analyzed 56 wild *Rubus* accessions sampled from coastal and foothill ecosystems. Total DNA was extracted from fresh leaf tissues. PCR amplification and sequencing targeted the plastid *rbcL* gene and nuclear ribosomal ITS1 and ITS2

spacers. Phylogenetic analyses were performed to assess genetic diversity, species clustering, and evidence of hybridization.

Results. The *rbcl* marker showed limited variation, grouping most accessions into two main clusters, which limited its discriminatory power at the species level. In contrast, ITS1 and ITS2 regions exhibited higher polymorphism, resolving six major clusters and eight unique haplotypes, including clear separation of taxa such as *Rubus caesius*, *R. irritans*, and *R. amabilis*. One accession carried a plastid haplotype typical of raspberry (*R. corchorifolius*), indicating hybrid origin. Clusters of genetically identical nearby plants suggest clonal propagation or recent hybrid lineages. Notably, geographic distance up to 140 km along the coast did not correspond to genetic divergence, suggesting weak spatial structuring.

These findings highlight the superiority of nuclear ITS markers over plastid *rbcl* for taxonomic and population studies in *Rubus* and demonstrate ongoing hybridization and clonal spread shaping regional genetic diversity.

This work was supported by the grant of the Russian Science Foundation № 24-16-20042.

РАЗРАБОТКА ГЕТЕРОТИПИЧЕСКОЙ 3D-МОДЕЛИ ГЛИОМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РОЛИ МИКРОГЛИИ В ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОГО ОТВЕТА НК-КЛЕТОК

Казакова А.А., Нуштаева А.А.

Направление «Иммунобиология и биомедицина», Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия

ВВЕДЕНИЕ: Глиомы – одни из наиболее агрессивных опухолей головного мозга, характеризующиеся высокой смертностью и устойчивостью к терапии. Важным компонентом микроокружения глиом является микроглия – резидентные макрофаги центральной нервной системы, способные как поддерживать рост опухоли за счет секреции цитокинов и ремоделирования

внеклеточного матрикса, так и участвовать в активации противоопухолевого иммунитета, включая НК-клетки. При глиомах функциональная активность микроглии изменяется, что снижает активность НК-клеток и способствует прогрессированию опухоли. Для изучения этих процессов необходимы физиологически релевантные 3D-клеточные модели.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Гетеротипические 3D-модели формировали из клеток глиобластомы U-87 MG и микроглии HMC3 в низкоадгезионных 96-луночных планшетах в среде DMEM/F-12 с добавками B-27, N-2, EGF и bFGF при 37°C, 5% CO₂. Варьировали плотность посева ($2,5\text{--}5 \times 10^3$ клеток) и соотношение HMC3:U-87 MG (1:1; 3:2; 4:1). Рост, жизнеспособность и локализацию клеток оценивали световой и флуоресцентной микроскопией (CellTracker™, PI/FDA/Hoechst).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: При оптимизации условий формирования гетеротипических 3D-моделей было показано, что их структура и жизнеспособность зависят от исходного числа и соотношения клеток. Более плотные и стабильные структуры формировались при 5000 клеток и соотношении HMC3:U-87 MG = 3:2, при этом доля нежизнеспособных клеток оставалась минимальной. Присутствие микроглии приводило к уплотнению и уменьшению диаметра сфероидов по сравнению с монокультурой глиобластомы. При помощи флуоресцентной микроскопии было показано, что микроглия локализуется преимущественно на периферии, тогда как клетки глиобластомы в центральной части, что отражает сложную пространственную организацию и повышает физиологическую релевантность модели.

ВЫВОДЫ: Оптимизированы условия формирования гетеротипических 3D-моделей из клеток глиобластомы U-87 MG и микроглии HMC3. Получена физиологически релевантная модель, воспроизводящая характерную пространственную организацию опухолевого микроокружения: микроглия располагается преимущественно по периферии, а клетки глиобластомы формируют центральную часть. Наибольшая стабильность и жизнеспособность достигаются при посеве 5000 клеток в соотношении HMC3:U-87 MG = 3:2.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Исследование было выполнено при финансовой поддержке проекта, реализуемого в рамках государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус» (Соглашение № 27-03 от 27.09.2024).

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ФОСФАТАЗЫ RRM1D В РЕГУЛЯЦИИ RIPK3-ЗАВИСИМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ

Колосова Е.Д.^{1,2}, Лисица Д.А.¹, Богданова Д.А.^{1,2}, Демидов О.Н.^{1,2}

¹ Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

ВВЕДЕНИЕ: Исторически считалось, что некроптоз является исключительно цитоплазматическим процессом. Недавние исследования показали, что ключевые компоненты некроптотического сигнального пути (RIPK3 и MLKL) способны к ядерной транслокации, что может указывать на вовлеченность молекул ядра в регуляцию некроптоза. Однако молекулярные механизмы этого процесса остаются малоизученными. Особый интерес представляет потенциальная роль ядерной фосфатазы RRM1D, которая участвует в регуляции множества сигнальных путей, связанных с клеточным стрессом и выживанием. Таким образом, целью данного исследования является определение роли RRM1D в регуляции RIPK3-зависимой гибели.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: В исследовании были использованы линии колоректального рака мыши MC-38 и человека HT-29, а также мыши C57BL/6 дикого типа и с нокаутом Rrm1d. Для оценки изменения фосфорилирования ключевых белков, связанных с некроптозом, использовался вестерн-блот анализ, ПЦР-РВ, иммуноцитохимия и секвенирование транскриптома. Для моделирования некроптоза на мышах была использована модель ишемического повреждения почки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Полученные экспериментальные данные продемонстрировали, что ингибирование фосфатазы PPM1D с использованием специфического химического ингибитора GSK2830371 приводит к значительному увеличению активаторного фосфорилирования эффекторов некроптоза (RIPK3 и MLKL). Генетическая инактивация в клетках и органах мышцы гена PPM1D приводила к повышению экспрессии гена ZBP1, являющегося белком, инициирующим некроптоз, что может снижать пороговый уровень запуска некроптотической гибели клеток.

ВЫВОДЫ: Таким образом, фосфатаза может быть вовлечена как в регуляцию инициирующих факторов некроптоза (ZBP1), так и влиять на финальные этапы клеточной гибели за счет дефосфорилирования центральных эффекторов некроптоза.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Работа выполнена при поддержке гранта государственной программы ФТ «Сириус» «Научно-технологическое развитие Федеральной территории «Сириус»» (Соглашение №3–03 от 18.02.2025).

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ НОВОГО БИСПЕЦИФИЧНОГО АНТИТЕЛА, НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО БИОДОСТУПНОСТЬ TNF ЧЕЛОВЕКА, ПРОДУЦИРУЕМОГО МИЕЛОИДНЫМИ КЛЕТКАМИ

Конев И.Ю.¹, Литвинова А.М.², Рыбцов С.А.¹, Шеуджен Т.М.³,

Недоспасов С.А.^{1,2,4}

¹Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия

²Центр высокоточных генетических технологий для медицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

³АО «БИОКАД», федеральная территория «Сириус», Россия

⁴Лаборатория молекулярных механизмов иммунитета, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ: Фактор некроза опухолей (TNF) является медиатором воспаления, обладающим также гомеостатическими функциями. При высокой продукции он играет центральную роль в патогенезе ряда хронических воспалительных заболеваний: ревматоидный артрит, болезнь Крона и другие. На основании генетических исследований на мышах возникло предположение, что «патогенный» TNF часто продуцируется миелоидными клетками. Для селективной нейтрализации миелоидного TNF в гуманизованных по TNF мышцах ранее были разработаны биспецифичные миниантитела MYSTI (myeloid-specific TNF-inhibitor), нацеленные против человеческого TNF (hTNF) и мышиног моноцитарного маркера F4/80 (Efimov et al., *PNAS* 2016). В настоящей работе исследуется новое биспецифичное миниантитело, адаптированное для человека, MYSTI-4 в мини-формате VHH-scFv (variable domain of the heavy-chain antibody - single-chain variable domain), а также MYSTI-4-Fc (VHH-Fc/scFv-Fc), способные одновременно связывать hTNF и поверхностный маркер миелоидных клеток CD14.

Цель исследования – оценить *in vitro* способности MYSTI-4 и MYSTI-4-Fc избирательно связываться с поверхностью миелоидных клеток и блокировать накопление растворимой формы hTNF в культуральной среде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: В исследовании была использована моноцитарная линия человека Mono-Mac-6, а также первичные моноциты человека, выделенные из периферической крови. Эффективность MYSTI-4 и MYSTI-4-Fc оценивали с помощью иммуноферментного анализа. Связывание биспецифичного антитела с клетками-мишенями определяли с помощью проточной цитометрии, используя биотинилированные варианты антител.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: В условиях *in vitro* биспецифичные антитела MYSTI-4 и MYSTI-4-Fc дозозависимо подавляли ЛПС-индуцированное накопление растворимого hTNF в среде культуры клеток Mono-Mac-6, а мини-формат – также у первичных моноцитов человека. Нейтрализующая активность MYSTI-4-Fc (с учетом размера белка) была сопоставима с мини-форматом. Проточная цитометрия подтвердила

специфическое связывание антител с CD14-позитивными моноцитами в образцах цельной крови человека, демонстрируя таргетное действие антител на миелоидные клетки.

ВЫВОДЫ: Новое биспецифичное антитело MYSTI-4 и его вариант MYSTI-4-Fc способны блокировать выход растворимого hTNF миелоидными клетками за счет связывания с поверхностью моноцитов через молекулу CD14

**АНАЛИЗ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МАРКЕРОВ
МИКРОГЛИИ И АСТРОГЛИИ ПОСЛЕ 2, 5 И 12-НЕДЕЛЬНОГО
ХРОНИЧЕСКОГО НЕПРЕДСКАЗУЕМОГО СТРЕССА НА ВЗРОСЛЫХ
*DANIO RERIO***

Котова М.М.¹, Амикишиев С.В.¹, Колесникова Т.О.¹, Мусиенко П.Е.¹

¹*Направление «Нейробиология», Научный центр генетики и наук о жизни,
Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория
«Сириус», Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Хронический стресс является одной из ведущих причин развития тревожных и депрессивных расстройств, которые занимают лидирующие места по распространенности среди психических заболеваний во всем мире. Согласно современным исследованиям важную роль в механизме патогенеза ЦНС при воздействии хронического стресса играет нейровоспаление, которое опосредуется активностью микроглии и астроглии. Несмотря на активное изучение патогенеза хронического стресса, проблема влияния стресса разной длительности остается малоизученной. Анализ нейровоспаления важен для понимания механизмов,объясняющих связь между хроническим стрессом, его продолжительностью и возникновением различных психических расстройств. Рыбы *Danio rerio* – модельный организм, обладающий генетическим и физиологическим сходством с человеком и активно использующийся в нейробиологических исследованиях, в том числе для

моделирования депрессивно-подобных состояний.

ЦЕЛЬ: оценить маркеры про- и противовоспалительной активности глии на разных стадиях развития аффективной патологии после 2, 5 и 12-недельного хронического непредсказуемого стресса на *Danio rerio*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: В работе использовалась модель хронического непредсказуемого стресса на *D. rerio*. В течение 12 недель животные подвергались воздействию различных стрессоров (социальная изоляция, экспозиция хищника, преследование сачком, яркий свет и т.д.) (Demin K.A. et al., 2021). После 2, 5 и 12 недель эксперимента проводился тест Нового аквариума (ТНА) для оценки тревожно-подобного поведения, и тест Иммобилизации хвоста (ТИХ) для оценки депрессивно-подобного поведения. Экспрессию про- и противовоспалительных маркеров микроглии и астроглии оценивали с помощью РТ-ПЦР в этих же временных точках.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: В результате работы было выявлено, что после 2 недель хронического стресса наблюдается снижение уровня тревожности и повышение уровня экспрессии провоспалительного маркера астроглии (*c3*). На 5 неделе хронического стресса наблюдалось увеличение тревожности, а также увеличение уровня экспрессии провоспалительных маркеров микроглии (*nos2a*, *cox2*) и глюкокортикоидного рецептора (*gr*). После 12 недель стресса наблюдается рост уровня тревожности и депрессивно-подобного поведения. При этом выявлено увеличение экспрессии противовоспалительных маркеров микро- и астроглии (*cd206*, *s100a10*, *ptx*).

ВЫВОДЫ: Таким образом с увеличением длительности хронического стресса происходит переход от тревожного к депрессивно-подобному поведению. При этом тревожное поведение сопровождается развитием нейровоспаления, тогда как при депрессивно-подобном поведении наблюдается противовоспалительная активность микро и астроглии.

Финансирование проекта осуществлялось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-10-2025-017 от 27.02.2025).

CHRONIC EFFECTS OF NITROGLYCERIN EXPOSURE ON BEHAVIORAL AND MOLECULAR BIOMARKERS IN ADULT ZEBRAFISH (DANIO RERIO)

Krivileva A.M.¹, Kotova M.M.¹, Kolesnikova T.O.¹

*¹Department of Neurobiology, Center for Genetics and Life Sciences, Sirius
University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Russia*

INTRODUCTION: Migraine is one of the most common and disabling neurological disorders, characterized by recurrent headache attacks, cognitive impairment, and increased anxiety-like behavior. Despite the high prevalence and clinical significance of chronic migraine, its molecular mechanisms remain insufficiently understood. The zebrafish (*Danio rerio*) has emerged as a valuable model organism in translational neuroscience due to its high genetic and physiology homology with mammals, well-characterized behavior and sensitivity to pharmacological manipulations. These characteristics make zebrafish a promising model for investigating the pathophysiology of migraine-like state. **Aim of the study** was to evaluate the chronic effects of nitroglycerin (NTG) on the behavior and gene expression profile in adult zebrafish (*Danio rerio*).

METHODS: Adult short-fin wild type zebrafish were exposed to nitroglycerin (4 mg/L) for 5 days via water immersion. Locomotor activity and anxiety-like behavior were assessed using the Novel Tank Test (NTT) calculated total distance travelled (cm), frequency and duration (s) of top entries, high mobile and immobile states. Gene expression levels of biomarkers (*igf1*, *znf541*, *il4r1*, *tlr2*, *tlr21*, *mthfr*, *ptgs2a*, *gper1* and *trpv1*) were analyzed using reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) analysis. Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney U-paired test.

RESULTS: Chronic nitroglycerin exposure induced a pronounced increase in anxiety-like behavior, manifested by decreased total distance (cm) and increased immobile state duration (s), however, unaltered top frequency and duration (s). RT-qPCR analysis revealed an elevated expression of pro-inflammatory genes *tlr21* and *znf541* with unaltered other gene expression following chronic 5-day NTG

administration compared to the control group.

CONCLUSION: Chronic administration of nitroglycerin promotes anxiety-like behavior and upregulates pro-inflammatory gene expression in adult zebrafish. These findings confirm sensitivity of *Danio rerio* to central effects of chronic NTG, suggesting potential translational model for studying migraine-like states and further studying of migraine pathogenesis and pre-clinical screening of anti-migraine drugs.

РАЗРАБОТКА ГЕТЕРОТИПИЧЕСКОЙ СФЕРОИДНОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ИЗ АСТРОЦИТОВ И КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ

Леонтьева А.А.¹, Нуштаева А.А.^{1,2}

¹*Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия*

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

ВВЕДЕНИЕ: Астроциты представляют собой глиальные клетки, которые играют решающую роль в функционировании центральной нервной системы (ЦНС). При злокачественных опухолях ЦНС, таких как глиобластома, астроциты становятся реактивными и участвуют во многих противоопухолевых и проопухолевых процессах. Для исследования роли астроцитов в прогрессии глиом необходимы физиологически релевантные модели. Наиболее релевантными клеточными моделями для моделирования микроокружения опухоли считаются 3D-модели. Цель работы заключается в разработке подхода к формированию гетеротипических 3D-моделей из астроцитов и опухолевых клеток глиобластомы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: в работе использованы линии астроцитоподобных клеток CCF-STTG1 и CCF-STTG1 RFP и линии клеток глиобластомы линии U-87 MG и U-87 MG GFP. 3D-модели формировали с использованием низкоадгезивного пластика и бессывороточной среды с

добавлением факторов роста в двух режимах: моно-культивирования (3D), при котором использовался только один тип клеток, и со-культивирования (3D-2), при котором в состав модели входили как астроциты, так и опухолевые клетки. Скорость и процесс формирования моделей отслеживали с помощью прибора CELENA X. Жизнеспособность клеток в составе моделей оценивали методом окраски FDA/PI/Hoechst 33342.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: скорость формирования 3D-2-моделей и 3D-моделей из астроцитов выше, чем скорость формирования 3D-моделей только из опухолевых клеток. На 1 сутки со-культивирования астроциты формируют плотный каркас в центре модели, вокруг которого располагаются опухолевые клетки. 3D-2 модели и 3D из астроцитов имеют более округлую форму, чем сфероиды только из опухолевых клеток глиобластомы. 3D из астроцитов и модели с соотношением астроцитов и опухолевых клеток 4:1 сохраняют округлую форму в течение всего времени наблюдения. Объем 3D-моделей из U-87 MG со временем увеличивается независимо от изначального количества клеток в сфероиде, в то время как объем 3D из CCF-STTG1 уменьшается. Среди 3D-2 моделей самое значительное увеличение объема наблюдается для сфероидов с соотношением астроцитов и опухолевых клеток 1:1 и начальным количеством клеток 2500. Меньше всего изменяется объем сфероидов с наибольшим количеством астроцитов в составе (4:1). Всё вышеперечисленное указывает на то, что астроциты вносят основной вклад в процесс компактизации модели. На 5 сутки культивирования наименее жизнеспособны 3D-модели из астроцитов и 3D-2 модели с соотношением астроцитов и опухолевых клеток 4:1, вероятно, за счет формирования плотного ядра из астроцитов в центре сфероида.

ВЫВОДЫ: в ходе работы были получены воспроизводимые модели, позволяющие исследовать взаимодействие астроцитов и опухолевых клеток глиобластомы. Показано, что астроциты вносят вклад в скорость формирования, жизнеспособность, а также изменение объема моделей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Исследование было выполнено при финансовой поддержке проекта, реализуемого в рамках государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус» (Соглашение № 27-03 от 27.09.2024)

ИЗУЧЕНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛОКУСЕ 9P21.3 В ОНКОГЕНЕЗЕ И УСТОЙЧИВОСТИ К ТЕРАПИИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Лисица Д.А.¹, Колосова Е.Д.^{1,2}, Демидов О.Н.^{1,2}, Богданова Д.А.^{1,2}

¹Направление «Иммунобиология и биомедицина», Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

В данном исследовании была проведена оценка влияния деметилирующего агента Вайдазы на эффективность противоопухолевых препаратов. Было показано, что комбинированное использование деметилирующего агента и противоопухолевых препаратов позволяет преодолеть лекарственную резистентность, однако эффективность такой терапии будет зависеть от характеристик опухолевых клеток.

ВВЕДЕНИЕ: колоректальный рак (КРР) занимает третье место по распространенности среди злокачественных опухолей во всем мире. Наряду с нестабильностью генома развитие КРР во многом обусловлено эпигенетической дисрегуляцией, в частности гиперметилированием ДНК, которое может приводить к инактивации генов-супрессоров опухолей и генов репарации ДНК.

Интерес представляет локус 9p21.3, содержащий ряд важных генов, участвующих в регуляции клеточных ответов на противоопухолевые препараты: гены ингибиторов циклин-зависимых киназ *CDKN2A* и *CDKN2B*, гены интерферонов (IFN) I типа.

Целью исследования была оценка влияния деметилирующего агента на эффективность противоопухолевых препаратов на клеточных линиях колоректального рака.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: в исследовании использовали клеточные линии колоректального рака DLD-1, HT-29 и HCT-116. Клеточные культуры инкубировали с деметилирующим препаратом Вайдаза (5-азациитидин), после чего оценивали изменение экспрессии генов локуса 9p21.3 методом ПЦР-РВ. Изменение пролиферации после обработки деметилирующим препаратом и сенолитиками (Навитоклакс, Венетоклакс) и противоопухолевым препаратом (5-фторурацил) оценивали при помощи МТТ-теста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: после обработки Вайдазой и/или 5-фторурацилом по результатам ПЦР-РВ в клеточных линиях DLD-1 и HT-29 наблюдали повышение маркеров сенесцентности: *CDKN2A* повысился в 4,9 и в 2,4 раза соответственно, *CDKN2B* повысился в 1,6 и в 4,7 раз соответственно. Далее клетки обрабатывали сенолитиками Навитоклакс и Венетоклакс. Сенесцентные клетки эффективно элиминировались под действием Навитоклакса, однако Венетоклакс не проявлял сенолитической активности.

ВЫВОДЫ: полученные данные демонстрируют эффективность применения комбинаций деметилирующих агентов и сенолитиков для преодоления устойчивости опухолевых клеток к классическим противоопухолевым препаратам.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: исследование поддержано грантом РНФ 25-25-20134.

ДЕТЕКЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА КОПИЙНОСТИ ГЕНОВ (CNV) ПО ПРОФИЛЯМ ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ПАРАФИНИЗИРОВАННЫХ ОБРАЗЦОВ АКТГ СЕКРЕТИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕЙ

**Луппов Д.В., Макарикова О.Л., Голоунина О.О., Матросова А.В.,
Бондаренко Е.В., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А., Симонов А.М.,
Белая Ж.Е., Буздин А.А.**

*Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический
университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Полиморфизм копийности генов - частое молекулярное событие в опухолях, и его крайне важно анализировать для получения полной картины aberrаций генома опухоли. Кроме того, ряд таких событий связан с назначением вполне определенной терапии, например, амплификация гена *ERBB2* и назначение Трастузумаба. В этом докладе будет приведен анализ данных полноэкзомного секвенирования АКТГ секретирующих опухолей, в частности анализ CNV.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Парафинизированные образцы из АКТГ секретирующий опухолей, полученные от 42 пациентов (34 аденомы гипофиза и 8 эктопических АКТГ секретирующих опухолей), были подвергнуты полноэкзомному секвенированию. После чего сырые прочтения были картированы на сборку генома GRCh38 при помощи алгоритма BWA-mem v2.2.1. CNV были найдены при помощи набора инструментов GATK с использованием панели норм, полученной из покрытия экзонов 20 здоровых субъектов. Для повышения точности сегментации генома в анализ был включен подсчет прочтений, поддерживающих каждую из аллелей. Визуализация и статистический анализ CNV были произведены при помощи языков Python и R.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Нами были получены наборы генов с полиморфизмами копийности для каждого из образцов. Анализ распределения делеций генов в геноме показал, что наибольшей плотности делеции достигают,

в регионах, близких к концам хромосом, что может свидетельствовать о дефектах в работе теломеразы. Мы действительно обнаружили низкую экспрессию гена *TERT* - главного компонента теломеразного комплекса. Из всей когорты экспрессию этого гена удалось детектировать только в 3х эктопических образцах. Более детальный анализ CNV позволил показать, что делеция этого гена была специфична для гипофизарных образцов. Последнее также поддерживается данными генной экспрессии и разницей в распределении количества делеций в прителомерных регионах между гипофизарными и эктопическими образцами.

Помимо этого, гены, чья делеция была характерна только гипофизарным образцам, согласно GO анализу отвечали за взаимодействие опухоли с иммунитетом. Интересно, что дубликации регионов генома, содержащих кластеры генов *KRTAP* - генов, ассоциированных с кератином - были обнаружены в 6-8 из 8 эктопических образцов, но только в 1-2 из 34 образцов опухолей гипофиза.

Анализ главных компонент также показал значительные отличия в характере CNV эктопических и гипофизарных образцов.

ВЫВОДЫ: CNV, являясь нетривиальными для обнаружения и анализа молекулярными событиями, были обделены вниманием предыдущих исследователей, изучавших геномы АКТГ секретирующих опухолей. Тем не менее, детально анализируя CNV, мы смогли показать явные различия в их паттернах между гипофизарными и эктопическими опухолями и охарактеризовать их возможную биологическую роль.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Работа выполнена в рамках проекта «Использующая искусственный интеллект платформа функциональной аннотации омиксных данных в биологии и медицине», включенному в программу научно-исследовательской деятельности научных групп Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», реализуемому в рамках исполнения обязательств по Соглашению от 07.07.2025 No 25-03;

*государственного задания Министерства науки и высшего образования
Российской Федерации № NZAF-2024-0030; проекта «ОнкоФьюжн» по
программе стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».*

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВАРИАНТОВ В N- ТЕРМИНАЛЬНОМ УЧАСТКЕ БЕЛКА CTCF, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Семичёва Д.И., Нурисламов А.Р., Гридина М.М., Фишман В.С.

*Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический
университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Трёхмерная архитектура хроматина крайне важна в регуляции активности генов, а её нарушение может приводить к развитию онкологических заболеваний. Одним из уровней пространственной организации хроматина являются топологически ассоциированные домены (ТАДы) – функциональные единицы интерфазного хроматина, формирующиеся посредством экструзии (“вытягивания”) петель хроматина когезиновым комплексом. Процесс экструзии останавливается при взаимодействии когезина с белком CTCF, поэтому сайты CTCF выступают границами ТАДов, тем самым обеспечивая колокализацию регуляторных элементов и их генов-мишеней. N-терминальный участок белка CTCF напрямую взаимодействует с субъединицами когезинового комплекса STAG1/2 и RAD21, стабилизируя его в основании ТАДа. Консервативный мотив KTYQR (13-33 а.о.) обеспечивает связывание с PDS5A, стабилизирующий когезин на хроматине, а аминокислоты в позициях 226-230 важны для взаимодействия со STAG1/2-RAD21. Миссенс-мутации в этих регионах являются «горячими точками», приводящими к потере когезин/CTCF-опосредованных петель, размыванию границ ТАДов и в целом нарушении экспрессии генов. Такие нарушения могут быть ассоциированы с различными заболеваниями, включая онкологические и наследственные генетические патологии. Однако характеристика функциональных последствий

мутаций белка CTCF за пределами небольшого числа горячих точек не проводилась. В частности, в данной работе мы предлагаем исследовать часто встречающиеся в опухолях варианты E14K, R29W, Y226C и G261S, а также вариант Y226A в качестве контроля, так как показано, что такая замена приводит к потере петель хроматина и нарушению границ ТАДов. Цель исследования – оценка влияния перечисленных вариантов на формирование когезин/CTCF-опосредованных петель и целостность границ ТАДов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Кандидатные варианты в N-концевом участке CTCF (E14K, R29W, Y226C, G261S) были выбраны на основе анализа частоты встречаемости и функционального потенциала соматических мутаций из баз данных COSMIC и TCGA. Сконструированы плазмиды с исследуемыми вариантами CTCF, которые были трансфицированы в клеточную линию HCT116-hCTCF-mAC. Такая клеточная линия позволяет индуцибельно деплецировать эндогенный CTCF посредством системы ауксин-зависимой деградации (AID2). После трансфекции проводилась сортировка клеток, эффективность которой оценивалась по интенсивности свечения Clover-метки, фиксация, проведение Hi-C и сборки библиотек для парно-концевого секвенирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: В ходе работы подтверждено, что замена Y226A ослабляет инсуляцию и препятствует образованию когезин/CTCF-опосредованных петель. Аналогичный эффект наблюдали в случае миссенс-мутации Y226C. Замена R29W, не оказывает значительного влияния на формирование когезин/CTCF-опосредованных петель и границ ТАДов.

ВЫВОДЫ: Варианты в N-терминальном участке CTCF, ассоциированные с развитием онкологических заболеваний, способны нарушать формирование когезин/CTCF-опосредованных петель и целостность границ ТАДов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Работа была выполнена при поддержке государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус» (Соглашение №26-03, 27/09/2024)

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ ШТАММА *LEUCONOSTOC MENTEROIDES* H32-02 KSU

Бондаренко К.Д., Шапошников Л.А., Розанов А.С., Сазонов А.Э.

Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия

ВВЕДЕНИЕ: *Leuconostoc mesenteroides* используется в производстве кисломолочных продуктов, обладает способностью продуцировать ряд вторичных метаболитов. Для получения современных штаммов часто необходимо использование методов генетического редактирования. В случае *L. mesenteroides* это достаточно сложная задача. Основным барьером, это отсутствие эффективных методов введения генетического материала в клетку, что связано с наличием прочной клеточной стенки, высокой активностью эндогенных нуклеазы и системами рестрикции–модификации (Р–М).

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: Разработать воспроизводимый протокол электропорации для *L. mesenteroides* H32-02 Ksu путём оптимизации ключевых параметров процесса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Штамм *L. mesenteroides* H32-02 Ksu из биобанка Университета «Сириус», штаммы *E. coli* для наработки плазмид. Плазмидный вектор рНус содержал гены резистентности к ампициллину (*E. coli*) и хлорамфениколу (МКБ).

Оптимизация проводилась по следующим параметрам: концентрация глицина на финальных стадиях культивирования (1–2,5%) в среде; параметры электрического импульса (напряжение 1,7–3 кВ); состав буферов для промывки и восстановления клеток, время инкубации после электропорации и концентрация хлорамфеникола. Источник плазмидной ДНК варьировался: использовались штаммы *E. coli* с разными профилями метилирования: Top10 - Dam⁺/Dcm⁺, Ec135 - Dam⁻/Dcm⁻ и MC1061 - Dam⁺/Dcm⁺/EcoKI. Наличие плазмид подтверждалось с помощью ПЦР-скрининга с колоний.

РЕЗУЛЬТАТЫ: Штамм H32-02 Ksu был успешно трансформирован. При

использовании базового протокола эффективность была ~20 КОЕ/мкг ДНК. Оптимальная концентрация глицина - 1%. При 2% и 2,5% трансформация не происходила. Снижение напряжения импульса с 2,0 кВ до 1,7 кВ увеличило эффективность в 3 раза (225 КОЕ/мкг ДНК). Напряжения 2,5 и 3 кВ оказались летальными для клеток. Необходимое время восстановления составило 3 часа в среде MRS с 0,5 М сахарозой. Оптимальная концентрация хлорамфеникола 7 мкг/мл. Предварительная промывка в 10 mM MgCl₂ с последующей промывкой 1 М сахарозой оказался критичным для прохождения трансформации.

Важным фактором оказалось метилирование плазмидной ДНК. Эффективность трансформации зависела от штамма, в котором нарабатывали плазмиду: MC1061 (800 КОЕ/мкг) > Ec135 (650 КОЕ/мкг) > Top10 (225 КОЕ/мкг). Использование MC1061 увеличило выход трансформантов в 3,5 раза, вероятно, благодаря совместимости метилирования EcoKI с P-M системами штамма.

Совокупная оптимизация обеспечила 40-кратное увеличение трансформационной эффективности относительно базовой — до 800 КОЕ/мкг ДНК при наработке плазмиды в *E. coli* MC1061.

ОБСУЖДЕНИЕ: Разработанный протокол обеспечил стабильную трансформацию *L. mesenteroides* H32-02 Ksu. Выявлена критическая роль метилирования плазмиды в совместимости с P-M системой реципиента. Протокол позволяет проводить направленную генетическую модификацию, применимую для различных приложений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Результаты получены при финансовой поддержке исследования/проекта/работы, реализуемого в рамках государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус» (Соглашение №18-03 от 10.09.2024).

РЕКОНСТРУКЦИЯ ПОТОКОВОЙ МОДЕЛИ ПЕРХЛОРАТРЕДУЦИРУЮЩЕЙ БАКТЕРИИ *DECHLOROMONAS* *AGITATA*

Мелихова Е.В.¹, Эсембаева М.А.¹, Качнов В.А.¹, Куляшов М.А.¹

¹*Направление «Вычислительной биологии», Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Перхлораты (ClO_4^-) – стойкие и высокорастворимые анионы, широко применяемые в производстве ракетного топлива и пиротехнических изделий. Благодаря их химической стабильности они накапливаются в почвах и грунтовых водах, представляя угрозу для экосистем и здоровья человека (Coates J. D., 2004). Перспективным подходом к их удалению является биологическое восстановление с участием перхлоратредуцирующих бактерий, способных полностью превращать перхлорат в безопасный хлорид при использовании ацетата в качестве донора электронов (Wang O., 2017). Настоящая работа посвящена реконструкции потоковой модели *Dechloromonas agitata*, что позволит исследовать ее метаболические особенности и механизмы восстановления перхлората.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Реконструкция метаболической модели была выполнена с использованием конвейера, реализованного в платформе BioUML (Kolpakov F., 2019), с применением инструментов Reconstructor (Jenior M. L., 2023) и gapseq (Zimmermann J., 2021) на основе геномной сборки ASM51904v1. Качество модели оценивалось с помощью библиотеки MEMOTE (Lieven C., 2020), а последующее курирование и корректировка проводились с использованием Cobrapy (Ebrahim A., 2013).

РЕЗУЛЬТАТЫ: Проведена автоматическая реконструкция и оценка качества потоковой модели для *Dechloromonas agitata* is5. В модель были внесены реакции восстановления перхлората, катализируемые ферментами комплекса перхлоратредуктазы (*pcrABCD*) и хлоритдисмутазой (*cld*), что

позволило учитывать использование перхлората в качестве конечного акцептора электронов (Bender K. S., 200. Для оценки корректности реконструированной потоковой модели *Dechloromonas agitata* проведен анализ метаболических потоков при различных условиях роста. На первом этапе была исследована зависимость скорости потребления перхлората и удельной скорости роста от интенсивности поступления ацетата в среду. Проведено сравнение полученных результатов с литературными данными. Дополнительно была проведена сравнительная оценка скорости роста при различных акцепторах электронов – перхлорате, нитрате и кислороде. Также выполнен анализ скорости роста модели на различных источниках углерода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Нами реконструирована первая потоковая модель перхлоратредуцирующей бактерии *Dechloromonas agitata*, которая служит основой для изучения механизмов ее адаптации к условиям биоремедиации перхлората. Разработанная модель также открывает перспективы для оптимизации биотехнологических процессов очистки экосистем, загрязненных перхлоратами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Исследование поддержано грантом Грант РНФ-25-24-20098 «Изучение механизмов биоремедиации в различных микробиологических сообществах с помощью подходов потокового моделирования».

GENOMIC REGIONS OF SOYBEANS ASSOCIATED WITH FLOWERING DATES

**Menkov M.T.^{1,2}, Seferova I. V.², Lepilova E.¹, Boyko A.P.³, Khlestkina E.^{1,2},
Bogush D.¹, Rozanova I.¹**

¹*Center for Genetics and Life Sciences, Sirius University of Science and Technology,
Sirius Federal Territory, Russia*

²*I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg,
Russia*

³*Adler Experimental Station – VIR branch, Sochi, Russia*

INTRODUCTION: Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) is a key protein and oil crop of global importance. One of the most critical parameters for its adaptation to specific soil and climatic conditions is the duration of the growing season, particularly the period from emergence to flowering. Traditional breeding methods for earliness require significant time investments. Modern breeding, based on DNA markers, can significantly accelerate this process. The aim of our research was to apply a genome-wide association study (GWAS) to identify genomic loci and SNP markers significantly associated with the variability in the duration of the period in a diverse soybean collection of various origins.

METHODS: Based on data from field trials of 169 soybean accessions (2023–2025, the Adler Experimental Station of VIR) and their genotyping by the GBS method, a GWAS was performed using a mixed linear model (Tassel 5.0).

RESULTS AND DISCUSSION: Forty-eight significant SNP markers were found. An analysis of their genomic distribution revealed both previously known QTLs and new promising loci on chromosomes Gm1 (115 cM), Gm6 (117 cM), Gm7 (34-36 cM), and Gm8 (116 cM).

CONCLUSION: A study of soybean varieties with different geographical origins in the coastal zone of the Black Sea allowed us to identify new markers associated with flowering time.

FUNDING: *This review was supported by the grant of the state program of the «Sirius» Federal Territory «Scientific and technological development of the «Sirius» Federal Territory» (Agreement №18-03 date 10 September 2024). The soybean sample formation was carried out within the topic (FGEM-2022-0002), and its genotyping was carried out within the program of the Center for Future Agrobiotechnology of VIR.*

ГЕТЕРОТИПИЧЕСКАЯ 3D- МОДЕЛЬ ГЛИОБЛАСТОМЫ, УЧИТЫВАЮЩАЯ КЛЕТКИ МИКРООКРУЖЕНИЯ ОПУХОЛИ

Никитина Ю.А.¹, Нуштаева А.А.^{1,2}

¹Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия

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

ВВЕДЕНИЕ: Глиомы представляют собой гетерогенную группу опухолей, глиального происхождения. Доступные современные подходы к лечению не обеспечивают терапевтической эффективности, и медиана выживаемости пациентов остается на уровне 12—15 месяцев. В развитии резистентности лечению, опухолевой прогрессии и метастазирования ключевую роль играет микроокружение опухоли. Понимание механизмов взаимодействия опухоли с микроокружением, а также воспроизведение процессов *in vitro* с использованием в доклинических исследованиях релевантных моделей может помочь в разработке новых эффективных подходов к терапии. Гетеротипические 3D-модели, состоящие из нескольких типов клеток, являются хорошими моделями для имитации гетерогенности опухоли и ее физиологии. Цель работы: создание гетеротипической 3D-модели глиобластомы *in vitro* на основе клеток опухоли и микроокружения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: В качестве клеточных моделей для создания 3D-моделей глиомы использовались: U-87-MG - клеточная линия мультиформной глиобластомы, CCF-STTG1- клеточная линия астроцитомы, НМС3- клеточная линия микроглиальных клеток. Формирование сфероидов проводилось с использованием низкоадгезивного пластика и среды без компонентов адгезии. Культивировали сфероиды в 2 режимах: моно- (3D) (один тип клеток), и со-культивирование в различных соотношениях клеток опухоли и клеток микроокружения, астроцитов и микроглии (3D-3). Для визуализации клеток использовался флуоресцентный (EVOS M5000) и/или конфокальный

микроскоп и окрашивание клеток CellTrackers™. Для оценки миграционных способностей клеток использовался тест на желатине, для оценки инвазивного потенциала- тест в субстрате из Matrigel™. Изображения сфероидов анализировались в программе ImageJ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Исследование динамики роста сфероидов показало, что монокультура глиобластомы формирует наиболее крупные сфероиды вне зависимости от общего количества клеток в модели. Сокультивирование со стромальными клетками способствует снижению скорости роста сфероидов. При формировании 3D-3 моделей клетки в составе сфероида подвергались пространственной самоорганизации, в результате которой астроциты служили структурным ядром сфероида, а клетки микроглии и глиобластомы располагались по периферии. Максимальной миграционной способностью обладали клетки в составе сфероидов из глиобластомы и микроглии. Миграционный потенциал 3D3 моделей превышал потенциал сфероидов из монокультуры глиобластомы. Микроглия и астроциты, будучи компонентами микроокружения, модулировали инвазивную активность глиобластомы.

ВЫВОДЫ: В ходе работы была разработана гетеротипическая 3D-модель глиобластомы, воспроизводящая ключевые аспекты опухолевого микроокружения. Стромальные компоненты оказывали влияние на формирование и рост сфероидов, изменяли миграционный и инвазивный потенциал опухолевых клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: *Исследование было выполнено при финансовой поддержке проекта, реализуемого в рамках государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус» (Соглашение № 27-03 от 27.09.2024).*

АРХЕОГЕНЕТИКА НАСЕЛЕНИЯ ТЕРРИТОРИИ БОСПОРСКОГО ЦАРСТВА СЕВЕРНОГО ПРИЧЕРНОМОРЬЯ В ХАЗАРСКОЕ ВРЕМЯ

**Окованцев В.С.¹, Манахов А.Д.^{1,2}, Рождественских Е.В.¹,
Добровольская М.В.³, Решетова И.К.³, Березина Н.Я.⁴, Котеньков С.А.⁵,
Рогаев Е.И.^{1,6}**

¹*Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия*

²*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия*

³*Институт археологии РАН, Москва, , Россия*

⁴*НИИ и музей Антропологии МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

⁵*Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН, Москва, Россия*

⁶*UMass Chan Medical School, Вустер, Массачусетс, США*

ВВЕДЕНИЕ: Цель исследования — применение современных палеогенетических методов для изучения вопросов формирования локальных этнокультурных групп Боспорского царства в VII-X веках, в период присутствия степных кочевых народов. Проект посвящен малоизученному, но ключевому для истории Евразии периоду в истории Понтийско-Каспийской степи. В рамках проекта будет создана и проанализирована уникальная коллекция образцов древней ДНК для отслеживания популяционных изменений в хазарский период. На основе генетических, археологических и исторических данных планируется реконструировать демографические события и выявить древние группы, внесшие вклад в генофонд современных популяций Евразии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ:

- Фрагмент ископаемой кости весом 70-150 мг измельчается в порошок с помощью гомогенизатора.
- Полученный порошок инкубируется в течение 3 часов с лизирующим буфером для выделения ДНК.
- Адсорбция ДНК проводится на спин-колонках, специально разработанных для выделения коротких фрагментов ДНК.

- Для подготовки одноцепочечных ДНК-библиотек используется 8-10 мкл полученного элюата.
- Библиотеки очищаются от несвязавшихся адаптеров с помощью электрофореза в агарозном геле.
- Полученные библиотеки проходят тестовое секвенирование на Illumina MiSeq и затем полногеномное секвенирование на Illumina NovaSeq.
- Биоинформатическая обработка:
 - Первичные данные обрабатываются с помощью программ AdapterRemoval (удаление адаптеров), bwa (картирование прочтений на референсный геном Hs37d5), Samtools (фильтрация дубликатов).
 - Проводится оценка посмертных повреждений ДНК (mapDamage) и контаминации современной ДНК (Schmutzi).
 - Митохондриальные гаплогруппы определяются с помощью инструмента Haplogrep и базы данных Yfull.
 - Анализ популяционных данных проводится с использованием методов PCA, READv-2, ADMIXTURE, f3-, f4-статистик и IBD.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: На данный момент собрана коллекция из 82 образцов с различных археологических памятников. Образцы находятся на стадии лабораторной обработки. Планируется дальнейшее пополнение коллекции. Проведено полногеномное секвенирование и биоинформатический анализ 3 образцов из Фанагории. Для них построены графики анализа главных компонент (PCA) и ADMIXTURE, проведён анализ с использованием методов f3-, f4-статистики и IBD. В дальнейшем планируется включить в анализ большее количество образцов. Основная задача — сравнить образцы хазарского времени с разных памятников между собой и с другими синхронными популяциями для определения генетических особенностей населения Боспорского царства в изучаемый период.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Палеогенетика Краснодарского края,
Соглашение № 18-03 от 10.09.2024, код проекта GEN-BFT-2407.

**ФАНТАСТИЧЕСКИЕ ТВАРИ И ГДЕ ОНИ ОБИТАЮТ:
МНОГООБРАЗИЕ И БИОТОПИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *LACTOBACILLACEAE*.**

Соколова Т.С.¹, Намсараев З.Б.¹, Вольф Е.Р.¹, Сазонов А.Э.¹,

Акбердин И.Р.¹

¹Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия

ВВЕДЕНИЕ: Семейство *Lactobacillaceae* объединяет микроорганизмы исключительной экологической и биотехнологической важности, играющие центральную роль в ферментации пищевых продуктов, поддержании здоровья и круговороте питательных веществ. Несмотря на их широкое разнообразие, глобальное распространение и экологическая специализация *Lactobacillaceae* изучены не до конца. Данное исследование было направлено на устранение этого пробела путем анализа более 2 000 000 записей из базы данных NCBI для картирования их присутствия в тысячах различных сред обитания и выявления перспективных направлений для поиска новых видов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Для сбора данных из NCBI Nucleotide использовался программный конвейер, разработанный на языке Python 3.12. Были извлечены все таксоны, входящие в семейство *Lactobacillaceae*, и для каждого из них были загружены соответствующие нуклеотидные последовательности и их метаданные, включая источник выделения (isolation_source) и географическое положение (geo_loc_name). Для анализа неструктурированных данных об источнике выделения была разработана иерархическая система классификации, разделяющая все места обитания на четыре основные группы: «Продукты», «Животные», «Окружающая среда» и «Растения».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Анализ показал, что пищевые продукты (56.4%) и организмы-хозяева (28.3%) являются основными экологическими нишами для представителей семейства. Таксоны

демонстрируют широкий спектр экологических стратегий: от универсалов с широкой адаптивностью, таких как *Lactiplantibacillus plantarum*, до узкоспециализированных видов, например, *Lactobacillus delbrueckii* и *Lactobacillus helveticus*, почти исключительно встречающихся в молочных продуктах.

Была выявлена серьезная географическая и экологическая предвзятость в отборе проб: большинство изолятов происходят из Восточной Азии, Европы и Северной Америки, в то время как Африка, Южная Америка и Центральная Азия практически не исследованы. Неклассифицированные таксоны чаще всего обнаруживались в желудочно-кишечном тракте животных, почве и, особенно, в тканях живых растений, что указывает на эти среды как на перспективные рубежи для открытия нового биоразнообразия. Результаты подчеркивают острую необходимость в расширении географии сбора образцов и внедрении стандартизированных практик депонирования данных с богатыми метаданными для проведения объективных крупномасштабных экологических и эволюционных анализов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Исследование выполнено при поддержке гранта государственной программы Федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие Федеральной территории «Сириус»» (Соглашение № 18-03 от 10 сентября 2024 г.).

СКОРОСТЬ БИОДЕГРАДАЦИИ НЕТКАНЫХ МАТЕРИАЛОВ ИЗ ПОЛИЛАКТИДА И БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ СМЕСЕВОГО ЭЛЕКТРОСПИННИНГА

Тлимахова С.А.¹, Царева А.Д.¹, Клинов Д.В.^{1,2,3}, Иванов Д.А.^{1,4}

¹Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия

²Московский физико-технический институт, Москва, Россия

³ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия

⁴ФИЦ ПХФ и МХ РАН, Черноголовка, Россия

ВВЕДЕНИЕ: Электроспиннинг — метод получения нетканых материалов из микро- и нановолокон полимеров. Получаемые матриксы имеют потенциал применения в тканевой инженерии, медицине, локальной доставке лекарственных препаратов и косметической промышленности (Agarwal S., 2008; Toloue, E.B., 2019; Abdul Hameed, M.M., 2023; Kang D., 2024). Метод основан на формировании полимерных волокон из растворов или расплавов под действием высокого напряжения. Такие конструкции имитируют внеклеточный матрикс, тем самым делая его перспективным для создания медицинских изделий. Композитные и смесевые добавки позволяют регулировать механические свойства, скорость биodeградации, биосовместимость и другие физико-химические свойства получаемых материалов. Целью данной работы стало изучение биodeградации матриксов из полилактида и белков плазмы для биомедицинских применений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Полимерные матриксы получали методом электроспиннинга из смеси полилактида (PLA, молекулярная масса (M_w) 110 кДа, NatureWorks, USA) и белков плазмы крови (свиная плазма крови, ЗАО «СК Короча», РФ) в соотношениях 9:1 и 7:3 соответственно. Плазму предварительно растворяли в смеси уксусной $C_2H_4O_2$ («Компонент-Реактив», РФ) и муравьиной CH_2O_2 («Русхим», РФ) кислот в соотношении 1:1. Далее, к полученному раствору в смеси с PLA, добавляли гексафторизопропанол (HFIP, Sigma-Aldrich) и перемешивали до полного растворения при комнатной температуре 25 °C.

Матриксы получали с помощью установки электроспиннинга (NF-500 MECC Co., Ltd., Япония). Смесь PLA/плазма загружали в шприц объемом 6 мл, скорость подачи раствора – 1 мл/час, диаметр сопла иглы – 22 калибр, расстояние от иглы до коллектора – 275 мм, напряжение – 35 кВ.

Морфология волокон была исследована методом сканирующей электронной микроскопии (Carl Zeiss Crossbeam 550) при ускоряющем напряжении 10 кВ и токе 300 пА.

Биodeградацию матриксов оценивали в течение 20 дней при 37 °C, фиксируя вес до и после погружения в фосфатно-буферный раствор и раствор

Фентона на 5, 10 и 20 сутки. Перед взвешиванием образцы промывали, сушили в вакууме и повторно взвешивали.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Анализ методом сканирующей электронной микроскопии показал, что исследуемые образцы состоят из гладких волокон. При увеличении концентрации плазмы в смеси (при одинаковых параметрах электроформования), уменьшается диаметр волокон и наблюдается тенденция к образованию неоднородных структур. Так, средний диаметр волокон в контрольном образце составляет 150 ± 30 нм, а в образцах с содержанием 10% и 30% плазмы - 140 ± 30 нм и 120 ± 20 нм соответственно. Контрольный образец и образец с содержанием плазмы 10% имели однородную волокнистую структуру, в то время, как в образце с содержанием плазмы 30% наблюдалось образование капель.

В рамках работы проводилось исследование зависимости скорости биodeградации смесевых матриксов от соотношения полилактид/белок плазмы крови. В качестве модельных растворов были выбраны фосфатно-буферный раствор и раствор Фентона для имитации нормальных условий и воспалительного процесса соответственно. Полученные данные демонстрируют ускорение процесса биodeградации при повышении концентрации белков плазмы крови в смеси. Кроме того, биodeградация образцов с высоким содержанием полилактида в растворе Фентона происходит интенсивнее, чем в фосфатно-буферном растворе.

Результаты исследования показали, что добавление белков плазмы к полилактиду способствует уменьшению диаметра и однородности волокон, а также ускорению биodeградации матриксов. Таким образом, варьируя соотношение полимеров, можно оптимизировать процесс биodeградации для его синхронизации с естественным процессом заживления ран.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: *Министерство науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-10-2021-093).*

ПОЛИМЕРНЫЕ МАТРИКСЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПЕРВИЧНЫХ КОРТИКАЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ

Царева А.Д.¹, Штоль В.С.², Коновалова С.П.¹, Арсентьев К.А.¹,

Клинов Д.В.^{1,3}, Мусиенко П.Е.¹, Иванов Д.А.^{1,4}

¹Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия

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

³Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия

⁴Institut de Sciences des Matériaux de Mulhouse–IS2M, CNRS UMR 7361, Мюлуз, Франция

ВВЕДЕНИЕ: Тканевая инженерия активно развивается в том числе из-за биополимеров и современных методов их обработки. Электроформование позволяет создавать нановолокнистые каркасы, имитирующие структуру внеклеточного матрикса. Такие материалы особенно перспективны для инженерии нервной ткани. Повреждения спинного мозга остаются критической проблемой, вызывающей потерю двигательных и сенсорных функций. Ограниченная способность центральной нервной системы к самовосстановлению и формирование рубцовой ткани препятствуют восстановлению даже при современных терапевтических подходах. Нановолокнистые каркасы из биоразлагаемых полимеров представляют собой перспективное решение для восстановления нервной ткани. Их высокая удельная поверхность, контролируемая пористость и специфическая морфология способствуют клеточной адгезии и направленному росту нейритов. Успешное применение таких каркасов требует оптимизации механических свойств (соответствия свойствам нервной ткани), пористости структуры и кинетики деградации полимера.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Электроформованные матриксы получали

из PLA и PCL с использованием различных систем растворителей (DCM, DCM/THF для пористых волокон, HFIP для гладких структур). Морфологию оценивали СЭМ, механические свойства — динамическим механическим анализом. Биосовместимость тестировали на первичной культуре кортикальных нейронов C57BL/6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: В ходе исследования было установлено, что состав растворителя существенно влиял на морфологию волокон и механические характеристики. PLA-матрикссы на основе DCM/THF демонстрировали механическую жёсткость, близкую к плотной мозговой оболочке, PCL-материалы — мягкость, соответствующую паренхиме спинного мозга. Пористые волокна обеспечивали лучшую клеточную адгезию. Материалы на основе HFIP показали цитотоксичность.

Матрикссы с пористой морфологией волокон демонстрируют оптимальное сочетание механических свойств и биосовместимости, что делает их перспективными для регенеративной медицины. Дальнейшие исследования будут сосредоточены на функционализации каркасов и анализе долгосрочной деградации *in vivo*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Финансирование проекта осуществлялось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-10-2021-093).

**CRISPR/CAS9-ОПОСРЕДОВАННОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ
ГЕНОВ *MYB5* И *OMT* КАК ИНСТРУМЕНТ НАПРАВЛЕННОГО
УВЕЛИЧЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ
СОЕДИНЕНИЙ У ЗЕМЛЯНИКИ (*FRAGARIA* SP.)**

Чурикова Д.А.¹, Прохорова А.П.¹, Физикова А.Ю.¹

¹*Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Фенольные соединения земляники, такие как эллаговая кислота и кверцетин, обладают доказанной антиоксидантной и сенолитической активностью, что делает их ценными мишенями для биотехнологии. Задача исследования состояла в направленном изменении метаболического профиля растения для увеличения содержания данных соединений с использованием технологии CRISPR/Cas9. В данном исследовании мы сфокусировались на редактировании двух ключевых генов – транскрипционного фактора *MYB5*, участвующего в регуляции пула фенолпропаноидов, и гена *OMT* (О-метилтрансфераза), играющего роль в специфических реакциях биосинтеза, с целью создания линий земляники с усиленным накоплением целевых фенольных соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Исследования проводили на тетраплоидном сорте земляники «Орлец». С помощью агробактериальной трансформации были получены растения-регенеранты с нокаутированными генами *MYB5* и *OMT* с использованием сконструированных CRISPR/Cas9 векторов. Эффективность редактирования подтверждали секвенированием по Сэнгеру и декомпозицией последовательностей при помощи TIDE и ICE инструментов. Количественное содержание эллаговой кислоты и кверцетина определяли методом ВЭЖХ-МС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Молекулярный анализ подтвердил успешное получение регенерантов с нокаутированными генами *OMT* (со 100% эффективностью редактирования) и *MYB5* (~50% клеток химерного растения). Проведенный метаболитный анализ выявил фундаментальные различия в фенольном профиле между полученными линиями и контролем дикого типа. Наиболее значительные изменения были зафиксированы у линий с нокаутом гена *MYB5*. Вопреки исходным ожиданиям, инактивация этого транскрипционного фактора привела к парадоксальному результату: если уровень эллаговой кислоты, как и предполагалось, снизился более чем в 2 раза, то общее содержание фенольных соединений, напротив, продемонстрировало трехкратный рост. При этом концентрация свободного кверцетина увеличилась в 2 раза, что впервые продемонстрировало вовлеченность *MYB5* в регуляцию

флавонолового пути земляники. Полученные на химерных регенерантах результаты предполагают еще более выраженные изменения состава метаболитов в стабильных гомозиготных линиях. Этот комплексный эффект позволяет предположить, что *MYB5* выполняет плеiotропную функцию, выступая в роли мастера-регулятора, который контролирует баланс между различными ветвями биосинтеза фенилпропаноидов. В случае нокаута гена *OMT* наблюдался иной, но не менее значимый эффект – синергичное увеличение содержания сразу нескольких целевых метаболитов: уровень эллаговой кислоты вырос в 5,3 раза, а содержание кверцетина – в 1,4 раза. Это первое исследование, где путем генетического редактирования было увеличено содержание эллаговой кислоты ягодной культуры. Дополнительным известным эффектом нокаута *OMT* является увеличение содержания фураниола в землянике, ответственного за карамельно-цветочный аромат ягод. Полученные результаты убедительно доказывают, что направленное редактирование генов *MYB5* и *OMT* представляет собой высокоэффективную стратегию для глубокой перестройки метаболизма земляники и создания линий с уникальным, обогащенным профилем биологически активных фенольных соединений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Работа выполнена при поддержке проекта «Сужение специфичности взаимодействия микробов и растений за счет обмена сигналами» (PBB-RND-2243).

АНАЛИЗ МЕТАБОЛИЗМА *LENTILASTOBACILLUS KEFIRI* DH5 МЕТОДАМИ ПОТОКОВОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

**Эсембаева М.А.¹, Куляшов М.А.¹, Соколова Т.С.¹, Акбердин И.Р.¹,
Сазонов А.Э.¹**

¹Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия

ВВЕДЕНИЕ: *Lentilactobacillus kefir* DH5 — штамм гетероферментативных лактобактерий, выделенный из ферментированного молока. Для некоторых штаммов *L. kefir* описаны пробиотические свойства, однако молекулярные и метаболические механизмы, которые могут объяснять их функциональные эффекты, до конца не изучены. Изучение метаболизма штамма на системном уровне позволяет выявить ключевые пути преобразования субстратов и формирования конечных продуктов ферментации, что важно для понимания его физиологических особенностей. В этом контексте потоковые математические модели являются инструментом для анализа возможных вариантов распределения метаболических потоков и проверки гипотез о метаболических возможностях микроорганизма.

В данной работе представлена первая потоковая модель метаболизма *L. kefir* DH5, с упором на описание метаболизма в анаэробных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Исходные модели были реконструированы с использованием различных инструментов: Kbase, Reconstructor, CarveMe, PanGEM и Bactabolize на основе референсного генома для *L. kefir* DH5 (геномная сборка - ASM973953v1). Качество реконструированных моделей оценивалось с помощью библиотеки MEMOTE. По результатам оценки была отобрана лучшая модель, для которой в дальнейшем проводилось ручное курирование с помощью библиотеки COBRApy в платформе BioUML. Для данной модели был модифицирован состав биомассы, включая стехиометрические коэффициенты компонентов в соответствии с уравнениями биомасс моделей iLM.c559 для *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, iBT721 для *Lactobacillus plantarum* WCFS1, Lreuteri_530 для *Lactobacillus reuteri* JCM 1112.

РЕЗУЛЬТАТЫ: На основании оценки MEMOTE, а также метаболического потенциала, для дальнейшей работы нами была выбрана модель, реконструированная. Первичная модель не воспроизводила продукцию характерных конечных продуктов гетероферментативного метаболизма: лактата и этанола. В процессе курирования корректировались баланс масс и зарядов,

направления реакций центрального метаболизма и состав компонентов биомассы. Удалены метаболиты, не связанные с биосинтезом биомассы, а также метаболиты для синтеза макромолекул (ДНК, РНК и белка) были выделены в отдельные реакции из уравнения биомассы. Обменные реакции в модели были ограничены в соответствии с составом питательной среды CDM. На основании данных из базы KEGG, в модель были внесены отсутствующие реакции и устранены термодинамически невозможные циклы.

После внесения изменений модель воспроизводила образование лактата и этанола, что согласуется с описанными экспериментальными данными для *L. kefir* DH5. В анаэробных условиях на среде CDM модель обеспечивала скорость роста $0,37 \text{ ч}^{-1}$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Была реконструирована первая потоковая модель для *L. kefir* DH5. Курирование модели позволило воспроизвести характерный профиль метаболитов для гетероферментативных молочнокислых бактерий: лактата, этанола и ацетата. Полученные результаты создают основу для дальнейшего анализа метаболизма *L. kefir* DH5 и исследования факторов, лежащих в основе его пробиотических свойств.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Исследование поддержано грантом
ФТ«Сириус» соглашение №18-03 от 10.09.2024.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МАШИННЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ НЕЙРОЛИПИНОВ НА СОСТОЯНИЕ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИИ

Арсентьев К.А.¹, Коновалова С.П.¹, Мусиенко П.Е.¹, Бобров М.Ю.¹

¹Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет
«Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия

ВВЕДЕНИЕ: Нейролипиды – эндогенные конъюгаты жирных кислот и

нейромедиаторов, проявляющие противовоспалительную активность через взаимодействие с рецепторами CB1/CB2 и TRPV1. Микроглиальные клетки, резидентные макрофаги ЦНС, меняют свою морфологию в зависимости от функционального состояния (фенотипы M1/M2), что позволяет использовать морфологический анализ для оценки нейровоспаления. Чтобы преодолеть ограничения традиционных методов оценки морфологии (трудоемкость, субъективность), мы применили машинное обучение (ML) на основе алгоритма Random Forest для точной количественной оценки активации микроглии в первичных культурах в условиях нейровоспаления и после обработки нейролипинами: AA-DA, DHA-DA, AA-5HT и EPA-5HT.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Первичные смешанные глиальные культуры получали из коры больших полушарий новорожденных мышей линии C57BL/6 (постнатальный день 1-2) и культивировали в среде DMEM. На 14 день *in vitro* культуры стимулировали 1 мкг/мл липополисахаридом (ЛПС) в течение 24 часов с последующей 24-часовой обработкой возрастающими концентрациями нейролипинов (2,5, 5, 10 и 20 мкМ); в контрольные лунки добавляли 0,1% ДМСО. После фиксации 4% формальдегидом клетки микроглии метили антителом к специфическому маркеру микроглии/макрофагов Iba1. Изображения получали с помощью конфокального микроскопа (ZEISS LSM 980 Airyscan). Морфометрический анализ проводили с использованием плагина MicrogliaMorphometry для Fiji. Для классификации морфологических типов клеток использовали алгоритм Random Forest, обучив его на отобранных морфометрических признаках, и оценили производительность модели. Проанализировано 1500 клеток; статистическую значимость определяли с помощью пермутационного теста PERMANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Итоговый набор признаков включал: индекс комплексности, отношение периметра к площади, периметр, среднюю длину ветвей скелета, радиус наибольшего вписанного круга, площадь сомы, лакунарность, площадь клетки и округлость. Классификатор на основе Random Forest продемонстрировал высокую точность на тестовой выборке

(Accuracy=0,975; F1-Score=0,977), причем признаками с наибольшим вкладом были индекс комплексности и площадь клетки. Эти признаки позволили добиться значительного разделения интактной и обработанной ЛПС групп по данным PCA и PERMANOVA ($F=59,70$, $p=0,0001$), что легло в основу обучения модели. Производные дофамина увеличивали долю клеток, подобных интактным, до 59,5% (20 мкМ AA-DA) и 51,3% (20 мкМ DHA-DA), тогда как производные серотонина проявляли активность при более низких концентрациях: 32,3% (2.5 мкМ AA-5HT) и 37,1% (5 мкМ EPA-5HT). Изменения морфологии, выявленные с помощью ML, сильно коррелировали со статистическим анализом наиболее значимого признака (площадь клетки). Дополнительно была проведена классификация для попытки разделить характерные фенотипы микроглии внутри исследуемых групп (амебоидный, гипертрофированный, разветвленный, биполярный), однако ее точность была ниже (Accuracy: 0,72; F1-Score: 0,73). Предложенный алгоритм ML продемонстрировал высокую точность в классификации микроглиальной морфологии, подтвердив свою полезность для оптимизации морфометрических оценок. Нейролипиды проявляли противовоспалительные эффекты, увеличивая долю клеток, подобных интактным, причем конъюгаты дофамина были более эффективны при высоких дозах, а производные серотонина проявляли активность на более низких концентрациях. Неоптимальная производительность морфологической модели для более узких микроглиальных фенотипов требует увеличения размера выборки для повышения точности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: *Результаты получены при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-25-20146.*

DANIO RERIO: ОТ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНОМА К БИОМЕДИЦИНЕ

**Колесникова Т.О.¹, Котова М.М.¹, Прохоренко Н.О.¹, Кривилёва А.М.¹,
Муслиенко П.Е.¹**

*¹Направление «Нейробиология», Научный центр генетики и наук о жизни,
Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория
«Сириус», Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Заболевания центральной нервной системы широко распространены в современном мире, однако их патологические механизмы плохо изучены, а данные расстройства зачастую не имеют эффективных методов лечения. Во всем мире более 300 миллионов человек страдают от депрессии, около 60 миллионов от биполярных расстройств, и 23 миллионов от шизофрении и других психических заболеваний. Стресс является одним из важнейших факторов, лежащих в основе патологических состояний ЦНС. Поиск клинически значимых биомаркеров, лежащих в основе нейробиологических механизмов патогенеза ЦНС, а также генетических и экологических факторов психопатологии – важнейшие задачи в разработке эффективных методов лечения заболеваний центральной нервной системы. Рыбы *Danio rerio* являются относительно новым модельным объектом для физиологических, нейробиологических и трансляционных исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Использование генетически разнородных рыб дикого типа (Wt) с одной стороны, позволяет моделировать реальные человеческие популяции, с другой, существенно ограничивает возможности оценить вклад отдельных генов в фенотипические характеристики патологий ЦНС. Существующие ибредные линии *Danio rerio* включают линии АВ, Tübingen, ABO и многие другие. Простота генетических манипуляций, легкость размножения и быстрый рост и развитие позволило создать более 1000 мутантных линий *Danio rerio*. Среди естественных мутантов выделяют линию *leopard (leo)*, получившая пятнистую окраску в результате мутации гена *connexin41.8*, которая представляет интерес как модельный организм для

изучения тревожных и депрессивных расстройств вследствие пониженного центрального серотонина и незначительного увеличения активности моноаминоксидазы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Сравнение рыб дикого типа и рыб линии *leo* выявило различия как в базовом уровне тревожности, так и в чувствительности к действию психоактивных веществ, подчеркивая таким образом вклад генетического фона. Рыбы линии *leo* также демонстрируют различия в поведенческих и молекулярно-генетических маркерах нейровоспаления после хронического непредсказуемого стресса, проявляющиеся в нетипичной реакции снижения уровня тревоги и экспрессии провоспалительных маркеров после стресса. Таким образом, использование альтернативных модельных организмов, например, рыб *Danio rerio* (zebrafish) для поиска эволюционно-консервативных маркеров патогенеза, является перспективным направлением трансляционной биомедицины.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Финансирование проекта осуществлялось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-10-2025-017 от 27.02.2025).

ОБНАРУЖЕНИЕ НОВЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ МИГРЕНЕПОДОБНОГО ПОВЕДЕНИЯ У ГРЫЗУНОВ

Икрин А.Н., Кочнева А.А, Фокеева Н.О., Мусиенко П.Е., Герасимова Е.В.

*Направление «Нейробиология», Научный центр генетики и наук о жизни,
Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория
«Сириус», Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Мигрень является одним из наиболее распространенных неврологических расстройств, затрагивающая около одной седьмой части

населения. Хронификация эпизодических мигренозных приступов приводит к значительному снижению качества жизни и трудоспособности у взрослого населения. Важную роль в патогенезе мигрени играет тригеминоваскулярная система, активация которой сопровождается выделением провоспалительных и вазоактивных медиаторов. Все больше данных указывает на участие нейровоспалительных процессов в хронификации мигрени, однако региональные особенности воспаления в различных структурах мозга остаются недостаточно изученными.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: Изучить нейровоспалительные процессы, изменения в глиальном микроокружении, активацию тучных клеток и транскрипционную активность маркеров воспаления в модели хронической мигрени, индуцированной нитроглицерином (НТГ) у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: В исследовании использовались самцы крыс линии Wistar с моделью хронической мигрени, индуцированной повторным Введением 10 мкг/кг НТГ в течение 10 дней абдоминально. Нами проводился анализ дегрануляции тучных клеток мягкой мозговой оболочки, иммуногистохимическую оценку маркеров глиальной активации, а также определение транскрипционной активности маркеров воспаления в таламусе, гиппокампе, соматосенсорной коре методом ПЦР в реальном времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Хроническое Введение НТГ сопровождалось выраженной нейровоспалительной реакцией, преимущественно в вентральных ядрах таламуса и зубчатой извилине гиппокампа. В этих зонах выявлено повышение экспрессии провоспалительного цитокина интерферона- γ (*Ifng*) и снижение уровня мРНК нейропротективного трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (*Tgfb1*). При этом в соматосенсорной коре подобных изменений не наблюдалось. Нами было отмечено, что степень дегрануляции тучных клеток мягкой мозговой оболочки при хронической мигрени была снижена, что, вероятно, отражает компенсаторно-защитный механизм. Региональная избирательность воспалительных изменений указывает на ключевую роль таламуса и гиппокампа в формировании центральной сенситизации и

когнитивных нарушений при хронификации мигрени.

ВЫВОДЫ: Хроническая нитроглицерин-индуцированная мигрень у крыс характеризуется очаговой нейровоспалительной реакцией, локализованной преимущественно в таламусе и гиппокампе. Таким образом, было установлено, что сочетание активации провоспалительных каскадов и снижения нейропротективных факторов может способствовать переходу мигрени из эпизодической формы в хроническую.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Настоящее исследование было поддержано
РНФ №23-15-00328.

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА TRH2 НА НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ В ГИППОКАМПЕ И ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ПОСЛЕ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА

**Коновалова С.П.^{1,2}, Ветлугина А.¹, Шиц Д.Д.³, Шкорбатова П. Ю.³,
Сысоев Ю.И.³, Мусиенко П.Е.^{1,2,3}**

¹*Направление «Нейробиология», Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус»,
Россия*

²*Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский
государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

³*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Травма спинного мозга (ТСМ) представляет собой тяжелое патологическое состояние, приводящее к стойким неврологическим нарушениям. Центральная серотонинергическая система играет ключевую роль в модуляции поведения и нейровоспалительных процессов после повреждения ЦНС. Нарушение ее функции, в частности при нокауте гена триптофангидроксилазы 2 типа (TRH2), критического фермента синтеза

серотонина, может существенно влиять на восстановление после ТСМ. Цель работы заключалась в исследовании влияния нокаута гена *TPH2* на нейровоспаление в гиппокампе, изучение долговременной памяти и социального поведения после моделирования латеральной гемисекции спинного мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Исследование выполнено на крысах линии Dark Agouti (дикого типа -WT и нокаутов- *TPH2* KO). Нокаутные животные были получены с использованием технологии цинк-пальцевых нуклеаз (ZFN), что привело к делеции в гене *Tph2* и нарушению синтеза серотонина в ЦНС. У всех животных была смоделирована левосторонняя латеральная гемисекция на уровне T8 сегмента спинного мозга. Для оценки поведения использовали тесты «Открытое поле», «Распознавания нового объекта (РНО) и тест «Социального взаимодействия» за неделю до и через 4 недели после операции. Нейровоспаление оценивали с помощью иммуногистохимического окрашивания срезов спинного и головного мозга на маркеры астроглии (GFAP, S100 β) и микроглии (Iba-1) с последующей количественной оценкой доли окрашенной.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: ТСМ вызвала значительное подавление исследовательского поведения и повышение тревожности у всех животных. Нокаутные животные (КО) демонстрировали исходно более низкую исследовательскую активность до операции и более выраженное снижение общей пройденной дистанции после операции по сравнению с WT. В тесте РНО у КО было зафиксировано достоверно меньшее время изучения нового объекта как до, так и после ТСМ ($p < 0,005$). Социальное поведение не имело значимых различий между группами. Иммуногистохимический анализ выявил значительное увеличение активации микроглии (маркер Iba-1) в гиппокампе у животных КО во всех исследованных зонах по сравнению с группой WT. При этом статистически значимых различий в экспрессии астроглиальных маркеров между группами обнаружено не было.

Полученные данные свидетельствуют, что дефицит центрального серотонина усилил микроглиальный, но не астроглиальный ответ в гиппокампе на фоне ТСМ, что может лежать в основе усугубления поведенческих и

когнитивных нарушений. По-видимому, нокаут гена TRH2 усугубляет нарушения исследовательского поведения и долговременной памяти, вызванные травмой спинного мозга. Дефицит центрального серотонина приводит к значительному усилению активации микроглии в гиппокампе после ТСМ, что указывает на ключевую роль серотонинергической системы в модуляции нейровоспалительного ответа. Астроглиальная реакция в гиппокампе и зоне повреждения спинного мозга не зависела от нокаута, что свидетельствует о более универсальном механизме ее активации в ответ на травму. Микроглия, в отличие от астроглии, демонстрирует повышенную чувствительность к нарушению серотонинергической передачи после ТСМ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: *Результаты получены при финансовой поддержке проекта, реализуемого в рамках государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус» (Соглашение № 18-03 от 10.09.2024).*

РОЛЬ TAAR5 В АДАПТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ НЕЙРОНАЛЬНЫХ И ГЛИАЛЬНЫХ СТРУКТУР СПИННОГО МОЗГА ПОСЛЕ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

Чесноков А.А., Милов С.И., Романюк Е.А., Калинина Д.С., Буглинина А.Д.

Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия

ВВЕДЕНИЕ: Травма спинного мозга представляет собой тяжелое патологическое состояние, характеризующееся высоким уровнем инвалидизации и стойким нарушением сенсомоторных функций. Повреждения при травме спинного мозга (ТСМ) принято классифицировать на первичные и вторичные. Первичное повреждение возникает вследствие непосредственного механического воздействия на ткани спинного мозга. Вторичное повреждение

представляет собой каскад молекулярно-биохимических процессов, опосредующих прогрессирующее поражение как в области травматического очага, так и в отдаленных структурах центральной нервной системы (ЦНС). К ключевым механизмам вторичного повреждения относятся кальциевый каскад, феномен глутаматной эксайтотоксичности, гиперактивация микроглии и макроглии с последующим формированием глиоза, индукция нейровоспалительного ответа и нарушение регуляции нейропластичности. Учитывая, что на современном этапе развития медицины ТСМ остается заболеванием с неудовлетворительными прогнозами восстановления, актуальной задачей является поиск новых фармакологических мишеней и разработка обоснованных терапевтических стратегий.

Перспективным классом таких мишеней являются рецепторы следовых аминов (Trace Amine-Associated Receptors, TAARs). В частности, для TAAR5, аналогично другим представителям этого семейства (в первую очередь, TAAR1), продемонстрирована способность к модуляции дофаминергической и серотонинергической нейромедиаторных систем. В экспериментальных исследованиях на линиях животных с нокаутом гена TAAR5 (TAAR5-KO) была выявлена повышенная чувствительность рецепторов 5-HT_{1A} к агонистам, а также зафиксированы изменения концентраций серотонина и его метаболитов в стриатуме, гиппокампе и гипоталамусе. В совокупности с данными о повышенном содержании дофамина в ряде церебральных регионов и увеличенной популяции дофаминергических нейронов у TAAR5-KO животных, наблюдаемые нейрохимические сдвиги способствуют формированию нейропластических и нейропротективных эффектов. Эти компенсаторные механизмы, по-видимому, могут быть вовлечены в частичное восстановление сенсомоторных функций после повреждения ЦНС.

В связи с всем вышеизложенным целью нашей работы является изучение адаптивных изменений нейрональных и глиальных структур спинного мозга после травматического повреждения у мышей с нокаутом гена TAAR5 и дикого типа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: В исследовании были использованы самцы и самки мышей дикого типа (TAAR5-WT) и с нокаутом гена, кодирующего TAAR5 — TAAR5- Δ - (TAAR5-KO), выведенные на основе линии C57Bl/6 (Black 6). Латеральная гемисекция для модели TCM была выполнена на уровне T7-T8 позвонков что соответствует сегменту T10 спинного мозга мыши. Для оценки восстановления животных после спинальной гемисекции использовался тест ходьбы по ровной поверхности (дорожка), на основе которых производилась оценка функционирования задних конечностей животных по шкале Тоямы. Морфологически, с применением антител, мы оценивали *iba-1+* (микроглия), GFAP+ (астроглия), S100b+ (астроглия ассоциированная с повреждением) популяции клеток в сером и белом веществе спинного мозга с контрастированием ядер гематоксилином ниже места травмы на 135 микрометров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Оценка по протоколу Тоямы показала статистически значимые различия восстановления локомоции для TAAR5-KO животных по сравнению с диким типом: общая динамика восстановления была достоверно выше у TAAR5-KO (двухфакторный дисперсионный анализ $F(1, 33) = 9,190$, $P=0,0047$). Морфологические исследования показали статистически значимые различия в количестве GFAP+ между группами TAAR5-KO и WT только для ипсилатерального канатика белого вещества: у TAAR5-WT GFAP+ клетки были более многочисленны в этой области (TAAR5-WT: $224,732 \pm 6,812$ кл./мм² vs TAAR5-KO: $190,398 \pm 49,232$ кл./мм², $P=0,0289$). В ипсилатеральном дорсальном роге у TAAR5-WT животных было больше *Iba1+* клеток, чем у TAAR5-KO животных (TAAR5-WT: $526,374 \pm 258,797$ кл./мм² vs TAAR5-KO: $405,759 \pm 151,668$ кл./мм², $P=0,0445$). Количественная оценка альфа-мотонейронов вентральных рогов серого вещества спинного мозга не показала значимых различий между группами TAAR5-WT и TAAR5-KO после TCM. С помощью поведенческих и морфологических методов мы показали, что TAAR5-KO мыши лучше восстанавливаются за счёт снижения воспаления и изменения количества клеток

глии в динамике, однако механизмы, лежащие в основе этих процессов, остаются до конца не известными.

ВЫВОДЫ: Динамика восстановления моторных функций у мышей TAAR5-KO выше по сравнению с TAAR5-WT; Количество астроцитов в латеральном канатике и количество микроглии в дорсальных рогах спинного мозга со стороны гемисекции у мышей TAAR5-WT больше, чем у мышей TAAR5-KO; Количественная оценка альфа-мотонейронов вентральных рогов серого вещества спинного мозга не показала значимых различий между группами TAAR5-WT и TAAR5-KO после TCM.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда №24-15-20036.

КЛЕТОЧНЫЕ МОДЕЛИ С ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ HIF-1-РЕПОРТЕРНОЙ СИСТЕМОЙ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОГО СКРИНИНГА СУПРЕССОРОВ ГИПОКСИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ В ГЛИОМАХ С РАЗЛИЧНЫМ МОЛЕКУЛЯРНЫМ ПРОФИЛЕМ

**Дорошенко В.О.¹, Ланских Д.В.^{1,2}, Гончаров Н.В.¹, Нгуен Л.¹,
Кумейко В.В.^{1,2}**

*¹Департамент медицинской биологии и биотехнологии, факультет
биофармацевтики, Дальневосточный федеральный университет, Владивосток,
Россия*

*²Лаборатория биотехнологии и молекулярной биоинженерии, Национальный
научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
Владивосток, Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Гипоксия, будучи ключевым драйвером онкогенеза глиом, оказывает плеiotропное воздействие на опухолевый метаболизм и микроокружение. В условиях кислородного дефицита подавление активности

пролилгидроксилаз ведет к стабилизации HIF-1 α — главного регулятора адаптационных ответов. Активация HIF-1-сигналинга ассоциирована с малигнизацией глиом: он индуцирует неоангиогенез посредством VEGF, усиливает инвазивность через эпителиально-мезенхимальный переход, запускает ремоделирование внеклеточного матрикса и способствует иммуносупрессии в опухолевой нише. Наиболее значимым клиническим следствием является консолидация гипоксия-индуцированной терапевтической резистентности, что требует разработки комбинированных стратегий, нацеленных на гипоксический пул клеток. Для адресации этой задачи мы разработали клеточную тест-систему на основе генетически модифицированных клеток глиомы U87MG с интактным генотипом и генетически редактированных клеток глиомы человека U87MG с индуцированной драйверной мутацией IDH1^{R132H}, которая является характерной для глиом низкой степени злокачественности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Для динамической визуализации гипоксических зон в клетках глиомы был создан химерный ген, кодирующий кислород-чувствительный домен деградации (ODD) субъединицы HIF-1 α , слитый с флуоресцентным репортером mCherry. Данная конструкция обеспечивает кислород-зависимую флуоресценцию, где интенсивность сигнала mCherry обратно пропорциональна активности кислород-зависимых пролилгидроксилаз. С использованием линейаризованной плазмидной конструкции провели трансфекцию клеток U87MG с исходным генотипом и U87MG-IDH1R132H. После селекции были получены клональные популяции, функциональная активность которых была валидирована путем индукции химической гипоксии с использованием хлорида кобальта. Модифицированные клетки использовали для создания трехмерных клеточных моделей в виде сфероидов, интегрированных в толщу композитных биополимерных материалов с компонентами нативного внеклеточного матрикса, имитирующих физико-химические свойства опухолевого микроокружения. Для начальной валидации платформы мы охарактеризовали модель, основанную на модифицированных

клетках U87MG с исходным генотипом, с использованием методов витального окрашивания флуоресцентными трейсерными красителями с последующей лазерной сканирующей микроскопией и получением трехмерных реконструкций сфероидов. Мы провели количественную оценку пространственно-временной динамики гипоксии в сфероиде и анализ инвазивного потенциала, ассоциированного с гипоксическими компартментами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Глиомные клетки с различным статусом мутации в гене IDH1 были модифицированы векторной конструкцией, несущей домен HIF-1 α , слитый с mCherry, для визуализации гипоксических состояний клеток. Сформированы трехмерные биоинженерные клеточные модели на основе сфероидов из модифицированных клеток и гидрогелей различного состава, в том числе содержащие компоненты ВКМ глиом. Количественный анализ выявил, что в пектин-коллагеновом гидрогеле сфероиды демонстрируют увеличение радиуса инвазии в 1,33 раза к 6-му дню культивирования. При этом гипоксическое ядро, визуализируемое по флуоресценции mCherry, увеличилось в 1,51 раза, что указывает на селективное преимущество и повышенную миграционную активность именно гипоксия-позитивного пула клеток. Сравнительный анализ гидрогелей различного состава показал, что присутствие коллагена — ключевого компонента ВКМ опухоли — служит мощным стимулом инвазии: в коллагенсодержащем матриксе инвазивный потенциал клеток был в 2,1 раза выше, чем в инертном пектиновом гидрогеле. Полученные данные подтверждают роль гипоксии и специфических сигналов ВКМ как драйверов инфильтративного роста глиом.

ВЫВОДЫ: Созданная модель позволяет визуализировать и количественно оценить размеры гипоксического ядра, а также активности HIF-1 в нем за счет флуоресцентной репортерной системы. Сконструированная модель, функционирующая как клеточный «сенсор» гипоксии, послужит необходимым инструментом для эффективного скрининга и идентификации препаратов, имеющих противоопухолевую активность, направленную на молекулярные каскады и регуляцию HIF-1, что обеспечит снижение негативных эффектов,

связанных с его активацией. А также, позволит определить молекулы-кандидаты для персонифицированной терапии IDH1-мутантных типов глиом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования РФ (№ FZNS-2023-0017).

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЙ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕЙРОСФЕР, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ hiPSC, И ИХ КОНГЛОМЕРАТОВ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА И АЛЬЦГЕЙМЕРА

**Копылова А.А.¹, Шумилин Р.В.¹, Волегова Д.Д.¹, Переплица Е.С.², Благова
А.В.², Салина К.О.¹, Ланикин И.К.¹, Куприянов П.И.¹, Зубова А.В.²,
Капкаева М.Р.², Симкин И.В.¹, Салмина А.Б.^{1,2}, Юрченко С.О.¹ и
Иллариошкин С.Н.²**

¹*Лаборатория клеточных технологий и тканевой инженерии, НОЦ «Мягкая
материя и физика флюидов», Московский государственный технический
университет им. Н.Э. Баумана, Москва, Россия*

²*Лаборатория нейробиологии и тканевой инженерии, Институт мозга,
Российский центр неврологии и нейронаук, Москва, Россия*

Трехмерные (3D) культуры, такие как нейросферы, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (hiPSCs), представляют собой мощный инструмент для изучения межклеточных взаимодействий, механизмов нейродегенерации и моделирования заболеваний. Целью данного исследования было проведение сравнительного морфометрического и иммуноцитохимического анализа нейросфер и их конгломератов, полученных из hiPSC пациентов с болезнью Альцгеймера (БА), болезнью Паркинсона (БП) и здоровых доноров. hiPSC были получены из лейкоцитов периферической крови, перепрограммированы и дифференцированы в нейрональные предшественники, после чего были сформированы 3D-культуры — нейросферы.

Иммуноцитохимическое окрашивание включало пролиферацию, нейрональную дифференцировку, маркеры воспаления, клеточные контакты и белки митохондриальной динамики. Профилирование продемонстрировало увеличение митохондриальных маркеров, снижение пролиферации и нейрональной дифференцировки.

16 морфометрических параметров были оценены с помощью специального алгоритма сегментации. Статистический анализ выявил групповые различия: нейросферы, полученные из PD и AD, оказались более круглыми, но с более нерегулярными границами. Конгломераты нейросфер AD были в целом меньше, что коррелировало со снижением пролиферации, показанным иммуноцитохимическим исследованием.

Для решения основной задачи — бинарной классификации конгломератов нейросфер (здоровые vs. болезнь Альцгеймера; здоровые vs. болезнь Паркинсона) — был применен комплексный подход. На этапе подготовки данных для отбора наиболее информативных признаков использовался генетический алгоритм (GA) из библиотеки DEAP. Далее проводилось сравнительное тестирование различных алгоритмов машинного обучения, по результатам которого для построения финальных моделей был выбран градиентный бустинг (XGBoost), показавший наилучшую производительность.

Оценка эффективности итоговых моделей подтвердила их высокую предсказательную способность: для классификации конгломератов, связанных с болезнью Альцгеймера, значение F1-меры составило 0.846; для классификации конгломератов, связанных с болезнью Паркинсона, значение F1-меры достигло 0.847.

Эти результаты показывают, что морфометрическое и иммуноцитохимическое профилирование, дополненное классификацией с помощью машинного обучения, обеспечивает чувствительную платформу для обнаружения специфических для заболевания изменений в 3D-нейронных культурах, полученных из hiPSC, и поддерживает их использование в исследованиях нейродегенерации.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО,
ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО И ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ
ГЕТЕРОЗИГОТНЫХ КРЫС С НОКАУТОМ НА ДОФАМИНОВЫЙ
ТРАНСПОРТЕР В МОДЕЛЯХ ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ МИГРЕНИ**

Кочнева А.А., Фокеева Н.О., Илюшичев В.Д., Луковиков Д.А.,

Мусиенко П.Е., Герасимова Е.В.

*Направление «Нейробиология», Научный центр генетики и наук о жизни,
Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория
«Сириус», Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Мигрень — одно из наиболее распространённых неврологических заболеваний, часто переходящее в хроническую форму с существенным снижением качества жизни. Несмотря на прогресс в терапии мигрени, механизмы хронификации остаются недостаточно изученными. Всё больше данных указывает на ключевую роль дофаминэргической дисфункции в возникновении ряда симптомов заболевания, таких как тошнота, рвота и сонливость. Также остается открытым вопрос нейровоспаления в патогенезе мигрени, который может иметь непосредственный вклад в хронификацию заболевания. Целью данной работы было изучение роли дофамина в развитии острой и хронической мигрени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: В данной работе впервые проведены исследования мигрени на линии трансгенных крыс с нокаутом на дофаминовый транспортер (DAT). Исследования проводились на гетерозиготах по нокауту гена DAT (DAT-НЕТ), а также крысах дикого типа без нокаута (DAT-WT). Были применены 2 модели мигрени: острая с индукцией распространяющейся корковой депрессий (РКД) *in vivo*, а также хроническая модель с Введением нитроглицерина (НТГ) раз в 2 дня в течение 9 дней.

В острой мигрени проводилась запись и анализ порога генерации РКД, а также ее амплитудно-временные характеристики. В модели хронической мигрени анализировались поведенческие различия у крыс двух генотипов. После введения НТГ животные проходили по батарее поведенческих тестов: тест

«темно-светлая камера», тест «температурная чувствительность хвоста» и тест «новый объект», а также определяли пороги механической чувствительности при помощи нитей фон Фрея.

По окончании моделирования хронической и острой мигрени забирались материалы для дальнейшего исследования активации менингеальных тучных клеток и маркеров нейровоспаления в области дорсального гиппокампа зонах CA1, CA3, *hilus*, молекулярном слое зубчатой извилины.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Исследование РКД не показало различий в пороге генерации РКД у крыс DAT-WT и DAT-HET, также анализ первой волны РКД не показал различий во времени начала генерации, длительности, полуширине, амплитуде и времени нарастания волны. Однако, скорость деполяризации РКД у крыс DAT-HET была ниже по сравнению с DAT-WT ($p < 0.05$). Межполушарное сравнение глиальных маркеров астроцитов (GFAP, S100 β) и микроглии (Iba-1) после индукции РКД показало более низкую плотность клеток, маркированных GFAP, в полушарии с индуцированной РКД по сравнению с контрлатеральным полушарием ($p < 0.05$) у крыс DAT-WT, а также более высокую плотность микроглиальных Iba-1⁺ клеток в полушарии с РКД у крыс DAT-HET ($p < 0.05$).

В модели хронической мигрени показано стойкое понижение порогов чувствительности у крыс двух генотипов уже на 3 час после первой инъекции НТГ ($p < 0.01$) по сравнению с контрольными значениями до введения, которое сохранялось в последующие дни эксперимента. Анализ температурной чувствительности хвоста показал понижение порогов чувствительности только у крыс линии DAT-HET на 7 ($p < 0.01$) и 9 ($p < 0.05$) день эксперимента. В тесте «темно-светлая камера» не было обнаружено изменений предпочтения одной из камер в течение всего периода моделирования мигрени у крыс DAT-WT и DAT-HET ($p > 0.05$).

В модели хронической мигрени анализ активации тучных клеток показал более низкие уровни дегрануляции у крыс DAT-WT и DAT-HET по сравнению с контрольными значениями ($p < 0.001$), а также показаны различия между

крысами с разным генотипом – у крыс генотипа DAT-HET контрольные значения активации тучных клеток значительно ниже, чем у крыс DAT-WT ($p < 0.0001$), что может указывать на модулирующее влияние дофаминэргической системы на функциональную активность менингеальных тучных клеток. Анализ окрашивания на маркеры астроцитов и микроглии в различных зонах гиппокампа не показали различий в плотности окрашенных клеток между DAT-WT и DAT-HET при хронической мигрени ($p > 0.05$).

ВЫВОДЫ: Полученные данные свидетельствуют о том, что частичная недостаточность дофаминавого транспортера (DAT-HET) не влияет на порог генерации и основные параметры распространяющейся корковой депрессии, однако сопровождается снижением скорости деполяризации, что может отражать изменённую возбудимость нейронных сетей. В модели хронической мигрени у всех животных развивается устойчивая гиперчувствительность, а у крыс DAT-HET наблюдается усиление термической гиперчувствительности на поздних этапах развития мигрени, что может указывать на модулирующую роль дофаминэргической системы в сенсорной дисфункции. Отсутствие выраженных изменений в поведенческих тестах и в активации глии при генотип-зависимой дегрануляции тучных клеток подчёркивает сложный и, вероятно, опосредованный нейроиммунный вклад дофамина в патофизиологию мигрени. В совокупности результаты подтверждают актуальность изучения дофаминэргических механизмов в контексте хронификации мигрени и формирования сенсорной гипервозбудимости.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Данная работа поддержана грантом
Российского Научного Фонда № 23-15-00328.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В СЕНСОМОТОРНОМ ВОССТАНОВЛЕНИИ ПОСЛЕ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА НА МОДЕЛИ КРЫС С НОКАУТОМ ГЕНА ТРИПТОФАН-ГИДРОКСИЛАЗЫ 2 ТИПА

Сысоев Ю.И.¹, Мусиенко П.Е.^{1,2,3}

*¹Лаборатория нейромодуляции двигательных и висцеральных функций,
Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия
²Направление «Нейробиология», Научный центр генетики и наук о жизни,
Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория
«Сириус», Россия*

*³Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский
государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Травма спинного мозга (ТСМ) затрагивает миллионы людей во всем мире. Одной из основных задач реабилитационных стратегий является восстановление и повышение пластичности спинномозговой сети, сохраненной или восстановленной после травмы. Серотонинергическая система, по-видимому, играет решающую роль в этих процессах, поскольку недавние исследования показали способность серотонинергических (5-НТ) аксонов к прорастанию и регенерации аксонов в ответ на травму или нейродегенерацию центральной нервной системы (ЦНС). В настоящей работе были использованы крысы с нокаутом гена триптофангидроксилазы 2 типа (TRH2 KO), у которых отсутствует центральный серотонин, для изучения роли серотонинергической системы в восстановлении сенсомоторной функции после ТСМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Эксперименты были выполнены на крысах-самках дикого типа WT и TRH2 KO. Травму спинного мозга моделировали методом левосторонней латеральной гемисекции на уровне Т8 позвонка под изофлюрановым наркозом. Оценку кинематики движения и моторно-координационной функции задних конечностей крыс проводили за неделю перед гемисекцией, а также в конце каждой недели в течение 4-х недель после операции в установке Motorater. Также у животных обеих групп проводили

оценку сенсорной функции конечностей в тесте «горячая/холодная пластина».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Было получено, что животные с нокаутом гена триптофангидроксилазы 2 типа имеют меньшую скорость восстановления сенсомоторных функций, демонстрируя большую степень сенсомоторного дефицита в тесте «Лесенка», а также медленнее восстанавливая кинематические характеристики локомоции по сравнению с животными дикого типа. В тесте «горячая/холодная пластина» не было получено статистически значимых различий между группами.

ВЫВОДЫ: Полученные данные подтверждают важность центрального серотонина для восстановления сенсомоторных функций у крыс после травмы спинного мозга, а также показывают релевантность TRH2 КО крыс как модели для изучения серотониновых механизмов нейропластичности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: *Результаты получены при финансовой поддержке проекта, реализуемого в рамках государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус» (Соглашение №18-03 от 10.09.2024)».*

РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ СЛЕДОВЫХ АМИНОВ (TAAR1 И TAAR5) В МОДУЛЯЦИИ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ ПОСЛЕДСТВИЙ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА

Калинина Д.С.^{1,2,3}, Романюк Е.А.¹, Буглинина А.Д.¹, Чесноков А.А.¹,

Павлова Н.В.⁴, Шкорбатова П.Ю.⁴, Мусиенко П.Е.^{1,2,4}

¹*Направление «Нейробиология», Научный центр генетики и наук о жизни,
Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория
«Сириус», Россия*

²*Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский
государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

³*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

⁴*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

ВВЕДЕНИЕ: Травма спинного мозга (ТСМ) представляет собой актуальную медико-социальную проблему, характеризующуюся не только первичными сенсомоторными и вегетативными нарушениями, но и развитием отдаленных системных последствий для ЦНС. К последним относятся тревожные и депрессивные расстройства, а также дефицит когнитивных функций, которые коррелируют с нейровоспалительными процессами в головном мозге, в частности, в гиппокампе. Воспалительные цитокины, высвобождаемые в зоне спинальной травмы, способны индуцировать воспаление в других отделах ЦНС, вызывая различные нарушения, причем как неврологические, так и связанные с психоэмоциональной сферой. В контексте поиска новых терапевтических мишеней значительный интерес представляют рецепторы следовых аминов, в частности, TAAR1 и TAAR5, экспрессия которых обнаружена в ЦНС и клетках иммунной системы. Настоящее исследование ставит целью комплексный анализ роли TAAR1 и TAAR5 в восстановлении после ТСМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: В работе использованы мыши с нокаутом соответствующих генов. Для моделирования ТСМ был использован метод латеральной левосторонней гемисекции между 7-м и 8-м позвонками (изофлуран 1,5%). Поведенческие характеристики оценивались с помощью теста Открытое поле до и на 35-ый день после ТСМ. Для анализа сенсомоторных функций и скорости восстановления проводилось Grasp тестирование на способность к активному сгибанию пальцев задних лап мышей, а также тест на функцию лап, в котором определялась работа голеностопного, коленного и тазобедренного суставов. Иммуногистохимический анализ срезов головного мозга животных с ТСМ проводился с использованием антител к GFAP и S100B. Полученные данные анализировались с помощью программного обеспечения RealTimer, EthoVision Noldus 17 и GraphPad Prism 9.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Показано, что отсутствие TAAR1 оказывает модулирующее влияние на тревожное и исследовательское поведение после ТСМ, не затрагивая при этом депрессивно-подобное состояние. В свою

очередь, дефицит TAAR5 ассоциирован со значительным улучшением восстановления специфических сенсомоторных функций, таких как активный захват и мобильность суставов задних лап. Полученные данные свидетельствуют о том, что оба рецептора вовлечены в патологические процессы после ТСМ, но оказывают влияние на различные аспекты неврологического дефицита: TAAR1 – преимущественно на эмоционально-поведенческую сферу, а TAAR5 – на двигательное восстановление.

ВЫВОДЫ: Таким образом, рецепторы следовых аминов TAAR1 и TAAR5 выступают перспективными молекулярными мишенями для разработки стратегий, направленных на коррекцию нарушений, вызванных травмой спинного мозга.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №24-15-20036.

СОДЕРЖАНИЕ

БИОТЕХ 2025	3

Биотехнологические лекарственные препараты

ПОЛУЧЕНИЕ PSCA-CAR-NK-КЛЕТОК И АНАЛИЗ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НА 2D КУЛЬТУРАХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ АНТИГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ <i>Вавилова Ю.Д., Величинский Р.А., Стрельцова М.А., Коваленко Е.И.</i>	4

РАЗРАБОТКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ГЕЛЯ НА ОСНОВЕ ЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАНЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ БАКТЕРИЯМИ С ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ <i>Васина Д.В., Антонова Н.П., Гуцин В.А.</i>	6

ИСКУССТВЕННЫЕ ВЕЗИКУЛЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ АЛЛОГЕННЫХ TREG- КЛЕТОК: ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА <i>Ганеева И.А., Змиевская Е.А., Некторова М.Е., Булатов Э.Р.</i>	9

РАЗРАБОТКА ХИМЕРНЫХ ЭНДОЛИЗИНОВ ПРОТИВ <i>STAPHYLOCOCCUS</i> <i>AUREUS</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОДХОДА КОМБИНИРОВАНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ И УЗНАЮЩИХ ДОМЕНОВ <i>Гасина М.И., Загоскин А.А., Нагорных М.О.</i>	11

РЕКОМБИНАНТНЫЕ МУЛЬТИВАЛЕНТНЫЕ АНТИТЕЛА НА ОСНОВЕ VNN, НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ ШИРОКИЙ СПЕКТР ВАРИАНТОВ SARS-COV-2 <i>Десюкевич П.Ю., Солодков П.П., Беловежец Т.Н., Чикаев А.Н.</i>	14

ДНК-АПТАМЕРЫ В ТЕРАНОСТИКЕ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ <i>Завьялова Е.Г., Нечаев А.Н.</i>	16

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ ВИРУСА МИКСОМЫ И
ДОКСОРУБИЦИНА НА МЫШИНОЙ BALB/C NUDE PDX МОДЕЛИ
САРКОМЫ МЯГКИХ ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА

*Исаева А.С., Ветчинова А.С., Ходакова Д.В., Аушева Т.В., Гончарова А.С.,
Малоголовкин А.С.*

18

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ
УНИВЕРСАЛЬНЫХ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ IGA-ИЗОТИПА
ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА

*Клотченко С.А., Плотникова М.А., Романовская-Романько Е.А.,
Алиев Т.К.*

21

ЛЕКАРСТВО БУДУЩЕГО ЗАЛОЖЕНО В ГЕНАХ: РЕЗУЛЬТАТЫ I ФАЗЫ
МНОГОЦЕНТРОВОГО КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕПАРАТА
СТИМОТИМАГЕН КОПОЛИМЕРПЛАЗМИД

*Кондратьева С.А., Жукова Л.Г., Самойленко И.В., Аширафян Л.А.,
Кокшаров М.О., Алексеенко И.В.*

25

УНИВЕРСАЛЬНЫЕ ТЯЖЕЛОЦЕПОЧЕЧНЫЕ АНТИТЕЛА,
НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ ШИРОКИЙ СПЕКТР ВАРИАНТОВ
ВИРУСА SARS-COV-2

Коробкова А.И., Фаворская И.А., Должикова И.В., Щебляков Д.В.

27

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА SCFV-ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ,
ОБЛАДАЮЩИХ НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ
ВИРУСОВ ГРИППА ТИПА А

Плотникова М.А., Клотченко С.А.

30

РЕГУЛЯЦИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ФЕНОТИПА
ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ СИНОВИОЦИТОВ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ
АРТРИТЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАПРАВЛЕННОГО БЛОКИРОВАНИЯ
ФНОА ДНК-АПТАМЕРАМИ

Соловьева А.О., Риппинен Д.В., Воробьева М.А., Королев М.А.

33

АПТАМЕРЫ БЛОКИРУЮТ ОБРАЗОВАНИЕ ХОЛЕСТЕРИНСОДЕРЖАЩИХ
ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ

Суркова Р.С., Собенин И.А., Орехов А.Н.

36

СОЗДАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ МИНИГЕНОВ АВСА4 ДЛЯ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ ШТАРГАРДТА <i>Шимченко Д. М., Кузьмин Е. А., Покидова К.С., Безсонов Е.Е., Бондарь Н.И., Коровина К. А., Пьявченко Г.А., Малоголовкин А.С.</i>	38
ДВОЙНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ КЛЕТКИ И СОСУДИСТОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ ОПУХОЛИ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИТАРГЕТНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГИБРИДНЫХ БЕЛКОВ <i>Яголович А.В., Исакова А.А., Долгих Д.А., Гаспарян М.Э.</i>	42
ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ВАКЦИННОГО ШТАММА 17D ВИРУСА ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКИ В ОТНОШЕНИИ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ <i>Бирюкова Ю.К., Трачук К.Н., Назаренко А.С., Орлова Е.А., Ворович М.Ф., Пестов Н.Б., Ишмухаметов А.А., Колясникова Н.М.</i>	44
ОЦЕНКА ПЕРЕКРЕСТНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА КАНДИДАТНЫХ ВАРИАНТОВ мРНК-ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА <i>Никифорова М.А., Клейменов Д.А., Гуцин В.А.</i>	47
БИОПОДОБНЫЕ ИНДУЦИРОВАННЫЕ МИКРОВЕЗИКУЛЫ: НОВАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВАКЦИН ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ <i>Ризванов А.А., Шкайр Л., Гаранина Е.Е., Хайбуллина С.Ф.,</i>	50
ИММУНОГЕННЫЕ И ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ВЕКТОРА НА ОСНОВЕ AD19, НЕСУЩЕГО ДВА ГЕНА ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А И В <i>Чугунова А.С., Голдовская П.П., Попова О., Зубкова О.В., Щедляков Д.В.</i>	53

Медицинская химия

СОЛИ ИМИДАЗОЛИЯ КАК ВОЗМОЖНАЯ ОСНОВА ДЛЯ НОВЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ <i>Кабанова А.А., Нарыкина А.И., Белоусова З.П.</i>	57

ПОЛИАЗОТИСТЫЕ ГЕТЕРОЦИКЛЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ
ИНГИБИТОРЫ РЕГУЛЯТОРОВ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

*Миколайчук О.В., Шемчук О.С., Протас А.В., Попова Е.А.,
Шаройко В.В., Семенов К.Н., Молчанов О.Е., Майстренко Д.Н.*

60

ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛИМЕРНОГО СОЕДИНЕНИЯ В
КАЧЕСТВЕ АНТИСЕПТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА

*Нечаева О.В., Тихомирова Е.И., Шнайдер Д.А., Заярский Д.А.,
Нестерова Т.Б.*

62

НОВЫЕ БЕНЗОАЗАКРАУН-ЭФИРЫ С КОМБИНИРОВАННЫМИ
ХЕЛАТИРУЮЩИМИ ГРУППАМИ КАК ХЕЛАТОРЫ ДЛЯ ^{64}Cu , ^{210}Pb и ^{177}Lu

Пашанова А.В., Зубенко А.Д., Замуруева Л.С., Литвиненко Е.А.

66

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛ-3-КИНАЗЫ
(PI3K) НА ОСНОВЕ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ
ТРИАЗИНОВОГО РЯДА: МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ, СИНТЕЗ

*Скрыльникова М.А., Петухова Н.В., Молчанов О.Е., Гранов Д.А., Майстренко
Д.Н.*

68

РАЗРАБОТКА ХЕЛАТОРОВ НА ОСНОВЕ ПИРИДИН-ДИАЗАКРАУН-
ЭФИРА ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО СВЯЗЫВАНИЯ КАТИОНОВ СВИНЦА

Тарасенко О.В., Щукина А.А., Зубенко А.Д., Иконникова И.С.

70

РАЗРАБОТКА РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ С АКТИНИЕМ-225 ДЛЯ
ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

*Тищенко В.К., Власова О.П., Вирясов М.Б., Рыжикова Т.П., Дороватовский
С.А., Степченкова Е.Д., Остроухов А.А., Щербакова А.Н., Федорова А.В.,
Чибисова О.Ф., Шегай П.В., Иванов С.А., Каприн А.Д.*

72

СИНТЕЗ НОВЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА
ГПП-1 НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ 1Н-БЕНЗИМИДАЗОЛА И 4Н-
ТРИАЗОЛ-3-ИЛБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ

*Толкачева Е.В., Салахов Т.Л., Салиев А.Ю., Краснодубец А.М., Иванов Р.А.,
Чернышов В.В.*

75

СИНТЕЗ НОВЫХ ГУАНИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АДЕНИНА -
ИНГИБИТОРОВ НАТРИЙ-ВОДОРОДНОГО ОБМЕННИКА ПЕРВОГО ТИПА
(NHE-1)

Финагеева М.О.

77

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННО
АКТИВНОГО ХРОМАТИНА В ЯДРАХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ
МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

*Яшина Е. Г., Варфоломеева Е. Ю., Пантина Р. А., Байрамуков В. Ю.,
Ковалев Р. А., Федорова Н. Д., Горшкова Ю. Е., Григорьев С. В.*

80

Системы доставки лекарственных препаратов

РАЗРАБОТКА СТИМУЛОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ *IN SITU* СИСТЕМ
НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ:
МЕТОДОЛОГИЯ И РЕАЛИЗАЦИЯ

Бахрушина Е.О.

82

АЭРОЗОЛЬНАЯ ТРАНСФЕКЦИИ КЛЕТОК ЛЕГОЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ
ПУТЕМ ОСАЖДЕНИЯ ЗАРЯЖЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК
В ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ.

Вакарина Л.Д., Антонова О.Ю., Тайлаков М.Е., Канев И.Л.

85

ПРИМЕНЕНИЕ ХИТОЗАНОВОГО ПОРИСТОГО НОСИТЕЛЯ ДЛЯ
ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Гапоян Л.М., Жиякова Е.Т., Веретенников Е.А., Мошкова А.О., Воронов А.В.

89

ВЛИЯНИЕ АГРЕГАЦИИ НАНОНОСИТЕЛЯ НА ТОКСИЧНЫЙ ЭФФЕКТ
ПРИ ДОСТАВКЕ ДОКСОРУБИЦИНА

Грабовой А.С., Горбачева В.И., Колесова Е.П.

91

СОЗДАНИЕ ПОЛИКОМПЛЕКСНОГО НОСИТЕЛЯ НА ОСНОВЕ
ПРОИЗВОДНЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ ГАСТРОРЕТЕНТИВНОЙ ДОСТАВКИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Заболотная У.Н., Тимергалиева В.Р., Мустафин Р.И.

95

РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В ВИДЕ МЕДИЦИНСКОЙ
ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ БИОДЕГРАДИРУЕМОЙ СИСТЕМЫ С
ПОЛИМЕРНЫМИ МИКРОИГЛАМИ

Золотарева М.С., Чуриков В.В., Панов А.В., Кедик С.А.

98

КОМБИНИРОВАННАЯ ПОЛИМЕРНАЯ НАНОРАЗМЕРНАЯ СИСТЕМА НА
ОСНОВЕ АМФИФИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИ-Н-
ВИНИЛПИРРОЛИДОНА С ПОВЫШЕННОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬЮ
ПРОТИВ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Куковьякина Е.В., Гаспарян М.Э., Яголович А.В., Кусков А.Н.

101

КОНЬЮГАТЫ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ С АЗАКРАУН-ЭФИРАМИ
В КАЧЕСТВЕ ПЕРСПЕКТИВНОЙ НАНОПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ
В РАДИОФАРМАЦЕВТИКЕ

*Меньшиков-Тонян М.А., Хабирова С.Ю., Алешин Г.Ю., Щукина А.А.,
Зубенко А.Д., Федоров Ю.В.*

103

АПРОБАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЕЗИКУЛ ДЛЯ ДОСТАВКИ ШАПЕРОНА
HSP70 - АКТИВАТОРА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУННОГО ОТВЕТА
*Штам Т.А., Гараева Л.А., Комарова Е.Ю., Емельянова С.С., Коневега А.Л.,
Маргулис Б.А., Гужова И.В.*

106

ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ И СТАНДАРТИЗАЦИИ ПЛЕНКООБРАЗУЮЩИХ
АЭРОДИСПЕРСНЫХ СИСТЕМ

Шумкова М.М., Пуя Г., Помыткина М.В., Бахрушина Е.О.

109

Разработка биотехнологических процессов

УДАЛЕНИЕ КОНЦЕВЫХ СИАЛОВЫХ КИСЛОТ ПРИВОДИТ К
ПОВЫШЕНИЮ УРОВНЯ АКТИВАЦИИ ИММУННЫХ КЛЕТОК

Березкина М.Э., Пенькова Е.В., Чернышова Д.О., Нисканен С.А., Виноходов Д.О.

113

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ FC-СЛИТНЫХ БЕЛКОВ С
СЕЛЕКЦИОННЫМИ МАРКЕРАМИ DHFR И GS НА ОСНОВЕ АПОПТОЗ-
РЕЗИСТЕНТНОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК CHO 4BGD

Воробьев И.И., Орлова Н.А., Синегубова М.В., Шайфутдинов Р.Р., Колесов Д.Э.

116

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОЧЕК ИНСЕРЦИИ ЦЕЛЕВЫХ ПЛАЗМИД В ГЕНОМ И
АНАЛИЗ СОБЫТИЙ ГЕНОМНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ЛИНИИ-
ПРОДУЦЕНТА НА ОСНОВЕ КЛЕТОК СНО ПРИ ПОМОЩИ
СЕКВЕНИРОВАНИЯ OXFORD NANOPORE

Колесов Д.Э., Синегубова М.В., Воробьев И.И., Орлова Н.А.

118

УСТРАНЕНИЕ УЗКИХ МЕСТ В ЭКСПРЕССИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ
ЗНАЧИМЫХ БЕЛКОВ КУЛЬТИВИРУЕМЫМИ КЛЕТКАМИ КИТАЙСКОГО
ХОМЯЧКА С ПОМОЩЬЮ БИОИНЖЕНЕРИИ СЕКРЕТОРНОГО ПУТИ

Орлова Н.А., Синегубова М.В., Колесов Д.Э., Ходак Ю.А., Воробьев И.И.

120

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ
ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ rAAV ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ АНТИТЕЛ *IN*
VITRO И *IN VIVO*

Рябова Е.И., Довгий М.А., Деркаев А.А., Дмитриев О.Е., Есмагамбетов И.Б.

122

ПОЛУЧЕНИЕ СБАЛАНСИРОВАННОГО ПРОДУЦЕНТА
ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ
КЛЕТОК СНО ПРИ ПОМОЩИ ПАРЫ БИ- И ТРИЦИСТРОННЫХ ПЛАЗМИД

Синегубова М.В., Воробьев И.И., Орлова Н.А., Клишин А.А.,

Зырянов Д.А., Ползиков М.А.

125

ПОДБОР УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *ESCHERICHIA COLI*,
ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК НРV

Ячменева А.А., Сычева В.С., Плетюхина Ю.В., Зверева В.А.,

Савельев Н.С., Рабдано С.О.

127

Аналитические методы в разработке лекарственных препаратов

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ТАРГЕТНОГО МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО
АНАЛИЗА α И β ЦЕПЕЙ ГЕМОГЛОБИНА В ЕДИНИЧНОМ ЭРИТРОЦИТЕ

Вавилов Н.Э., Згода В.Г.

131

РАЗРАБОТКА МЕТОДА АНАЛИЗА ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ
ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Каргополов И.А.

133

КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ СПОСОБ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Киселева А.А., Герасимова Т.С., Гусаров Д.А., Луценко И.А.

..... 137

IN VITRO ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ RDH12
ГЕНОЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ АМАВРОЗА ЛЕБЕРА 13 ТИПА

*Павлова П.А., Аверина М.В., Панферов Е.В., Иванов Р.А., Карабельский А.В.,
Минская Е.С.*

..... 141

Трансляционные исследования

ПОЛУЧЕНИЕ И ИММУНОГЕННАЯ ОЦЕНКА N-БЕЛКА *HANTAAN*
ORTHOHANTAVIRUS ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ
ГЕМОРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

*Андреева Н.Ю., Мартынова Е.В., Давидюк Ю.Н., Насыров Т.Р.,
Хайбуллина С.Ф., Ризванов А.А., Кабве Э.*

..... 144

АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КАЛЛУСОВ И НАТИВНЫХ
РАСТЕНИЙ СОЛОДКИ

Ермошин А.А., Лотоцкий С.О., Матыков Н.Е., Киселёва И.С.

..... 147

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ИММУНОПАТОГЕНЕЗА
ДЕРМАТОМИОЗИТА

Киреев Б. В., Никитич А. А., Соколов В. В., Песков К. В., Волкова А. А.

..... 151

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ
АНТИБИОТИКОВ КЛАССА СТРЕПТОГРАМИНОВ

*Коневега А.Л., Полесскова Е.В., Шуленина О.В., Пичкур Е.Б., Толстыко Е.А.,
Касацкий П.С., Сергеев П.В.*

..... 154

РАСТВОРИМЫЙ БЕЛОК sE ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА –
ПОМОЩНИК В ПОИСКЕ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Красильникова А.А., Додина М.С., Козловская Л.И.

..... 157

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ
ЖИДКОСТЕЙ ШТАММОВ РОДА *HERICIUM*

Лысакова В.С., Синева О.Н., Исакова Е.Б., Краснопольская Л.М.

..... 159

ВЛИЯНИЕ ТЕТРАПЕПТИДОВ НА ПРОЦЕССЫ УЛЬТРАКРАТКОСРОЧНОЙ ГАБИТУАЦИИ У КРЫС WISTAR, ПОДВЕРГШИХСЯ ПРИНУДИТЕЛЬНОМУ ПЛАВАНИЮ

*Макеева Д.И., Саванец О.Н., Кравченко Е.В., Бородина К. В.,
Грибовская О. В., Зильберман Р.Д., Бизунок Н.А., Дубовик Б.В.*

..... 161

**БЕЛКИ ЕРАС – ПЕРСПЕКТИВНАЯ БИОМИШЕНЬ ДЛЯ СОЗДАНИЯ
ОРИГИНАЛЬНЫХ КАРДИОПРОТЕКТОРОВ**

*Мокров Г.В., Воробьева Т.Ю., Столярук В.Н., Крыжановский С.А.,
Дорофеев В.Л.*

..... 164

**ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКА ENTPD1 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ МИШЕНИ
ТЕРАПИИ ГЛАУКОМЫ НОРМАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ МЕТОДОМ
МЕНДЕЛЕВСКОЙ РАНДОМИЗАЦИИ**

Плотников Д.Ю.

..... 166

**ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫЕ СИНОВИОЦИТЫ, КАК ОСНОВА *IN VITRO*
МОДЕЛИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ
АНТИЦИТОКИНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Риптинен Д.В., Соловьева А.О.

..... 168

**ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ ФРАГМЕНТА АРГИНИН-
ВАЗОПРЕССИНА НА ПОВЕДЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ГРЫЗУНОВ**

Саванец О.Н., Кравченко Е.В., Ольгомец Л.М., Бородина К.В.

..... 171

**ЦИАНОКОБАЛАМИН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК ТЕРМОФИЛЬНОГО
МИКРООРГАНИЗМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ
БИОСЕНСОРОВ ВИТАМИНА В₁₂**

Симоненко С.Ю., Кульдюшев Н.А.

..... 175

**ОБОСНОВАННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ НЕФРОПРОТЕКЦИИ ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ**

Сорокина Л. Е., Шевандова А. А., Фомочкина И. И.

..... 179

ЭФФЕКТЫ СОЕДИНЕНИЯ 745-В-40 В БАТАРЕЕ ПСИХОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТОВ У КРЫС WISTAR, ПОДВЕРГШИХСЯ ДПФС <i>Степанова Е.В., Саванец О.Н., Сикита Д.В., Гуринович Е.В.</i>	182
ИНГИБИРОВАНИЕ PSMD10 И ЕГО ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ: КОМБИНИРОВАННЫЕ ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ <i>Травникова Д.Ю., Абакумова Т.О., Котелевцев Ю.В.</i>	185
ИНТЕГРИН $\alpha 3 \beta 1$ КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ <i>Файзуллина Э.А., Малабуйок Д.М., Серова О.В., Мокрушина Ю.А., Смирнов И.В., Габибов А.Г., Терехов С.С.</i>	187
ВАЛИДИРОВАНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ФАРМОКОЛОГИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ IN VIVO ПРИ ПОМОЩИ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ <i>Шашковская В.С., Цитрина А. А., Андрейченко И. Н., Микаелян А. С., Халимани Н., Нестерчук М. В., Верлов Н. А., Котелевцев Ю. В.</i>	188
РАЗРАБОТКА IN VITRO ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ИМИДЖИНГА КЛЕТОК ОТ ПАЦИЕНТА <i>Южакова Д.В., Изосимова А.В., Сачкова Д.А., Кононова А.И., Шумская И.С., Гамаюнов С.В., Дуденкова В.В., Елагин В.В., Щеславский В.И., Яшин К.С., Юсубалиева Г.М., Баклаушев В.П., Ширманова М.В.</i>	192
ТЕХНОГЕНЕТИКА 2025	195
БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ КОНЬЮГАТОВ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ И АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ С КУЛЬТУРАМИ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ <i>Аседулина М.Ш., Князева О.А.</i>	197
СИСТЕМ ДОСТАВКИ НА ОСНОВЕ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ ПО ДАНЫМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ <i>Ахметова А.И., Яминский Д.И., Никитин Н.А., Яминский И.В.</i>	199

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА И ДЕТЕРМИНАНТ УСТОЙЧИВОСТИ К ФАКТОРАМ СРЕДЫ ДЛЯ МАРКЕР- АССОЦИИРОВАННОЙ СЕЛЕКЦИИ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ УРАЛА <i>Васильева Ю.С., Чертов Н.В., Сбоева Я.В., Жуланов А.А., Боронникова С.В.</i>	201
ВЫРАЩИВАНИЕ РЕДКИХ ГРИБОВ (ЛЬВИНАЯ ГРИВА, ШИИТАКЕ, РЕЙШИ, СИНЯЯ ВЕШЕНКА И ДРУГИЕ, В ДОЛГОСРОЧНОЙ ПЕРСПЕКТИВЕ ТРЮФЕЛИ) НА ПИЩЕВЫХ ОТХОДАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ <i>Веремьев Д.Н.</i>	203
ПОЛОВОЙ ДИМОРФИЗМ В ГЕНЕТИЧЕСКОЙ И КЛЕТОЧНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ У <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> . <i>Веселкина Е.Р., Рощина Н.В., Пасюкова Е.Г.</i>	205
ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РЕЗИДЕНТНЫХ ШТАММОВ В МИКРОБИОТЕ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА <i>Данилова О.А., Сенина А.М., Маркелова М.И., Пономарева Е.Р., Максимова К.А</i> <i>Синягина М.Н., Хуснутдинова Д.Р., Григорьева Т.В.</i>	208
КОНСТРУИРОВАНИЕ БЕЗМАРКЕРНОГО ШТАММА <i>КОМАГАТАЕЛЛА</i> <i>РНАФФИИ</i> ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ КУТИНАЗЫ <i>APNCUT1</i> ИЗ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА <i>AUREOBASIDIUM PULLULANS</i> ВКМ 1116 <i>Ф.К. Ермилов, Е.В. Журишкина, Е.В. Энейская, А.А. Кульминская,</i> <i>И.А. Сизова</i>	210
ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА КЛЕТОК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЯИЧНИКОВ КРЫС, ПЕРЕНЕСШИХ ПРЕНАТАЛЬНЫЙ СТРЕСС <i>Есалиева М.С, Курьянова Е.В.</i>	212
<i>IN SILICO</i> ПОИСК И АНАЛИЗ РАЗНООБРАЗИЯ СТРУКТУР CRISPR-CAS- СИСТЕМ В ГЕНОМАХ ПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ <i>CLOSTRIDIUM</i> <i>VOTULINUM</i> С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ ТАРГЕТНЫХ ФАГОВЫХ ПРЕПАРАТОВ <i>Кахиани К.Б., Джисоев Ю.П., Тетерина Г.А., Арефьева Н.А., Борисенко А.Ю.,</i> <i>Букин Ю.С.</i>	217

EFFECTS OF VALPROIC ACID ON BEHAVIOR IN ZEBRAFISH MODELS OF CHRONIC STRESS

Kozlova E., Jiale Chu, Yingze Wang, Gaomuyi Wang, Meitong Zhou, Xuesong Xie, Yufei Bai, Jiahao Cui, Longen Yang, Kalueff A.V.

..... 218

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ В ОТВЕТ НА ИЗМЕНЯЮЩИЕСЯ УСЛОВИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Мартюшова В.Г., Кондрашов Б.С., Донцова К.А., Пчелинцев М.И., Седых С.Е.

..... 220

АНАЛИЗ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ И РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ВИРУСОВ КАРТОФЕЛЯ В АГРОЦЕНОЗАХ ПЕРМСКОГО КРАЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР-РВ

Печенкина В.А., Наговицына В.О., Лисина Т.Н.

..... 222

ИЗУЧЕНИЕ ВКЛАДА ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА ГЕНА ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NFκB В РАЗВИТИЕ ЮВЕНИЛЬНОГО ИДИОПАТИЧЕСКОГО АРТРИТА.

Осипова А. С., Галимова Э. М.

..... 224

СОЗДАНИЕ IN SILICO БИБЛИОТЕКИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОМОТОРОВ ДЛЯ ТОНКОЙ РЕГУЛЯЦИИ GUM-ОПЕРОНА У XANTHOMONAS CAMPESTRIS

Панькина К.Ю.

..... 225

ЛАБОРАТОРИЯ НА ЖЕСТКОМ ДИСКЕ, ИЛИ КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ АРХИТЕКТУР ИИ-МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ПОМОЩИ В ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ

Пермяков С.С.

..... 227

ЛИНИЯ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩАЯ CD44-GFP, ДЛЯ МОНИТОРИНГА ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Сёмчина А. А., Рыжкова А. Ю., Першина А. Г.

..... 228

ВЫБОР ЭФФЕКТИВНЫХ АПТАМЕРОВ К БЕЛКОВЫМ МИШЕНЯМ

Сулима А.О., Ивко В.Л., Копылов А.М.

..... 230

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ
РЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА У КУРИЦЫ В УСЛОВИЯХ
ХОЛОДОВОГО СТРЕССА

Грушина В.А, Пинтус С.С.

231

ОПТИМИЗАЦИЯ МУЛЬТИФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ КЛЕТОЧНОЙ
ПСЕВДОВИРУСНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ
РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ SARS-COV-2

*Гулова С.М., Ершова А.Е., Павлова А.В., Ризатдинова С.Н., Шумеев А.Н.,
Недоспасов С.А., Астраханцева И.В.*

233

MANAGING SYMBIOSIS SPECIFICITY OF *PISUM SATIVUM* L. WITH
RHIZOBIA VIA *PsLykX* GENE EDITING

*Igor Yu. Zhuravlev, Andrew G. Matveenko, Igor A. Tikhonovich and
Vladimir A. Zhukov*

235

IDENTIFICATION OF HYBRIDS AND SPATIAL GENETIC PATTERNS IN
RUBUS VIA *rbcL* AND ITS BARCODING

*Igor Zhuravlev, Anton Korzhuk, Elena Tyurina, Elena Markova, Mikhail Menkov,
Lilija Shipilina, Alexey Rozanov*

236

РАЗРАБОТКА ГЕТЕРОТИПИЧЕСКОЙ 3D-МОДЕЛИ ГЛИОМЫ ДЛЯ
ИЗУЧЕНИЯ РОЛИ МИКРОГЛИИ В ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОГО
ОТВЕТА НК-КЛЕТОК

Казакова А.А., Нуштаева А.А.

237

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ФОСФАТАЗЫ PPM1D В РЕГУЛЯЦИИ RPK3-
ЗАВИСИМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ

Колосова Е.Д., Лисица Д.А., Богданова Д.А., Демидов О.Н.

239

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ НОВОГО БИСПЕЦИФИЧНОГО АНТИТЕЛА,
НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО БИОДОСТУПНОСТЬ TNF ЧЕЛОВЕКА,
ПРОДУЦИРУЕМОГО МИЕЛОИДНЫМИ КЛЕТКАМИ

Конев И.Ю., Литвинова А.М., Рыбцов С.А., Шеуджен Т.М., Недоспасов С.А.

240

АНАЛИЗ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МАРКЕРОВ МИКРОГЛИИ И АСТРОГЛИИ ПОСЛЕ 2, 5 И 12-НЕДЕЛЬНОГО ХРОНИЧЕСКОГО НЕПРЕДСКАЗУЕМОГО СТРЕССА НА ВЗРОСЛЫХ *DANIO RERIO*
Котова М.М., Амикишиев С.В., Колесникова Т.О., Мусиенко П.Е.

..... 242

CHRONIC EFFECTS OF NITROGLYCERIN EXPOSURE ON BEHAVIORAL AND MOLECULAR BIOMARKERS IN ADULT ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)
Krivileva A.M., Kotova M.M., Kolesnikova T.O.

..... 244

РАЗРАБОТКА ГЕТЕРОТИПИЧЕСКОЙ СФЕРОИДНОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ИЗ АСТРОЦИТОВ И КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ
Леонтьева А.А., Нуштаева А.А.

..... 245

ИЗУЧЕНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛОКУСЕ 9P21.3 В ОНКОГЕНЕЗЕ И УСТОЙЧИВОСТИ К ТЕРАПИИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Лисица Д.А., Колосова Е.Д., Демидов О.Н., Богданова Д.А.

..... 247

ДЕТЕКЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА КОПИЙНОСТИ ГЕНОВ (CNV) ПО ПРОФИЛЯМ ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ПАРАФИНИЗИРОВАННЫХ ОБРАЗЦОВ АКТИВНО СЕКРЕТИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕЙ

Луппов Д.В., Макарикова О.Л., Голоунина О.О., Матросова А.В., Бондаренко Е.В., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А., Симонов А.М., Белая Ж.Е., Буздин А.А.

..... 249

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВАРИАНТОВ В N-ТЕРМИНАЛЬНОМ УЧАСТКЕ БЕЛКА СТСФ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Семичёва Д.И., Нурисламов А.Р., Гридина М.М., Фишман В.С.

..... 251

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ ШТАММА *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* H32-02 KSU

Бондаренко К.Д., Шапошников Л.А., Розанов А.С., Сазонов А.Э.

..... 253

РЕКОНСТРУКЦИЯ ПОТОКОВОЙ МОДЕЛИ ПЕРХЛОРАТРЕДУЦИРУЮЩЕЙ БАКТЕРИИ <i>DECHLOROMONAS AGITATA</i> <i>Мелихова Е.В., Эсембаева М.А., Качнов В.А., Куляшов М.А.</i>	255
GENOMIC REGIONS OF SOYBEANS ASSOCIATED WITH FLOWERING DATES <i>Menkov M.T., Seferova I. V., Lepilova E., Boyko A.P., Khlestkina E., Bogush D., Rozanova I.</i>	256
ГЕТЕРОТИПИЧЕСКАЯ 3D- МОДЕЛЬ ГЛИОБЛАСТОМЫ, УЧИТЫВАЮЩАЯ КЛЕТКИ МИКРООКРУЖЕНИЯ ОПУХОЛИ <i>Никитина Ю.А., Нуштаева А.А.</i>	258
АРХЕОГЕНЕТИКА НАСЕЛЕНИЯ ТЕРРИТОРИИ БОСПОРСКОГО ЦАРСТВА СЕВЕРНОГО ПРИЧЕРНОМОРЬЯ В ХАЗАРСКОЕ ВРЕМЯ <i>Окованцев В.С., Манахов А.Д., Рождественских Е.В., Добровольская М.В., Решетова И.К., Березина Н.Я., Котеньков С.А., Рогаев Е.И.</i>	260
ФАНТАСТИЧЕСКИЕ ТВАРИ И ГДЕ ОНИ ОБИТАЮТ: МНОГООБРАЗИЕ И БИОТОПИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА <i>LACTOBACILLACEAE.</i> <i>Соколова Т.С., Намсараев З.Б., Вольф Е.Р., Сазонов А.Э., Акбердин И.Р.</i>	262
СКОРОСТЬ БИОДЕГРАДАЦИИ НЕТКАНЫХ МАТЕРИАЛОВ ИЗ ПОЛИЛАКТИДА И БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ СМЕСЕВОГО ЭЛЕКТРОСПИННИНГА <i>Тлимахова С.А., Царева А.Д., Клинов Д.В., Иванов Д.А.</i>	263
ОЛИМЕРНЫЕ МАТРИКСЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПЕРВИЧНЫХ КОРТИКАЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ <i>Царева А.Д., Штоль В.С., Коновалова С.П., Арсентьев К.А., Клинов Д.В., Мусиенко П.Е., Иванов Д.А.</i>	266
CRISPR/CAS9-ОПОСРЕДОВАННОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ <i>МУВ5</i> И <i>ОМТ</i> КАК ИНСТРУМЕНТ НАПРАВЛЕННОГО УВЕЛИЧЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ У ЗЕМЛЯНИКИ (<i>FRAGARIA SP.</i>) <i>Чурикова Д.А., Прохорова А.П., Физикова А.Ю.</i>	267

АНАЛИЗ МЕТАБОЛИЗМА *LENTILASTOVACILLUS KEFIRI* DN5 МЕТОДАМИ
ПОТОКОВОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Эсембаева М.А., Куляшов М.А., Соколова Т.С., Акбердин И.Р., Сазонов А.Э.

..... 269

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МАШИННЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ НЕЙРОЛИПИНОВ
НА СОСТОЯНИЕ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИИ

Арсентьев К.А., Коновалова С.П., Мусиенко П.Е., Бобров М.Ю.

..... 271

DANIO RERIO: ОТ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНОМА К БИОМЕДИЦИНЕ

Колесникова Т.О., Котова М.М., Прохоренко Н.О., Кривилёва А.М.,

Мусиенко П.Е.

..... 274

ОБНАРУЖЕНИЕ НОВЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ
ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ МИГРЕНЕПОДОБНОГО ПОВЕДЕНИЯ У
ГРЫЗУНОВ

Икрин А.Н., Кочнева А.А., Фокеева Н.О., Мусиенко П.Е., Герасимова Е.В.

..... 275

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА *TRH2* НА НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ В
ГИППОКАМПЕ И ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ПОСЛЕ ТРАВМЫ
СПИННОГО МОЗГА

Коновалова С.П., Ветлугина А., Шиц Д.Д., Шкорбатова П. Ю.,

Сысоев Ю.И., Мусиенко П.Е.

..... 277

РОЛЬ *TAAR5* В АДАПТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ НЕЙРОНАЛЬНЫХ И
ГЛИАЛЬНЫХ СТРУКТУР СПИННОГО МОЗГА ПОСЛЕ
ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

Чесноков А.А., Милов С.И., Романюк Е.А., Калинина Д.С., Буглинина А.Д.

..... 279

КЛЕТОЧНЫЕ МОДЕЛИ С ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ *hIF-1*-РЕПОРТЕРНОЙ
СИСТЕМОЙ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОГО СКРИНИНГА СУПРЕССОРОВ
ГИПОКСИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ В ГЛИОМАХ С РАЗЛИЧНЫМ
МОЛЕКУЛЯРНЫМ ПРОФИЛЕМ

Дорошенко В.О., Ланских Д.В., Гончаров Н.В., Нгуен Л., Кумейко В.В.

..... 282

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЙ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
НЕЙРОСФЕР, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ hPSC, И ИХ КОНГЛОМЕРАТОВ ПРИ
БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА И АЛЬЦГЕЙМЕРА

*Копылова А.А., Шумилин Р.В., Волегова Д.Д., Переплица Е.С., Благова А.В.,
Салина К.О., Ланикин И.К., Куприянов П.И., Зубова А.В., Капкаева М.Р.,
Симкин И.В., Салмина А.Б., Юрченко С.О. и Иллариошкин С.Н.*

..... 285

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО, ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО
И ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ГЕТЕРОЗИГОТНЫХ КРЫС С
НОКАУТОМ НА ДОФАМИНОВЫЙ ТРАНСПОРТЕР В МОДЕЛЯХ ОСТРОЙ
И ХРОНИЧЕСКОЙ МИГРЕНИ

*Кочнева А.А., Фокеева Н.О., Илюшичев В.Д., Луковиков Д.А.,
Мусиенко П.Е., Герасимова Е.В.*

..... 287

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В
СЕНСОМОТОРНОМ ВОССТАНОВЛЕНИИ ПОСЛЕ ТРАВМЫ СПИННОГО
МОЗГА НА МОДЕЛИ КРЫС С НОКАУТОМ ГЕНА ТРИПТОФАН-
ГИДРОКСИЛАЗЫ 2 ТИПА

Сысоев Ю.И., Мусиенко П.Е.

..... 290

РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ СЛЕДОВЫХ АМИНОВ (TAAR1 И TAAR5) В
МОДУЛЯЦИИ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ ПОСЛЕДСТВИЙ ТРАВМЫ
СПИННОГО МОЗГА

*Калинина Д.С., Романюк Е.А., Буглинина А.Д., Чесноков А.А., Павлова Н.В.,
Шкорбатова П.Ю., Мусиенко П.Е.*

..... 291

НАУЧНОЕ ИЗДАНИЕ

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ

Саммита разработчиков
лекарственных средств

«Сириус.Биотех»

Форума генетических технологий

«Сириус.Техногенетика»

Под общей редакцией:

Иванова Романа Алексеевича, PhD, директора Научного центра трансляционной медицины, председателя Учёного совета АНОО ВО «Университет «Сириус»;

Сазонова Алексея Эдуардовича, д.м.н., исполнительного директора Научного центра генетики и наук о жизни АНОО ВО «Университет «Сириус».

Формат 60×84/16.
Усл. печ. л. 21,0.
Уч.-изд. л. 19,5.

Тираж 500 экз.
Заказ № mru03-2025

Издано в авторской редакции.

ООО «Альпен-Принт»
115230, г. Москва, Электролитный проезд, 3А, с2

Подписано в печать 22.12.2025.

© НТУ Сириус, 2025
© ООО «Альпен-Принт», 2025



РИНЦ



DOI

ISBN 978-5-6055294-6-0



9 785605 529460 >

