

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**Сборник тезисов
3-й Всероссийской школы-конференции
«Биохимия – основа наук о жизни»,
посвященной памяти профессора В.Г. Винтера
г. Казань, 7–9 ноября 2024 г.**

**Казань
2024**

УДК 579
ББК 28
С 23

*Рекомендовано к размещению в электронном архиве
Научной библиотеки им. Лобачевского Учебно-методической комиссией
кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии
(Протокол № 6 от 25.12.2024г.)*

Научный редактор
доктор биологических наук, профессор З.И. Абрамова

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

Редакционная коллегия:
кандидат биологических наук, доцент О.А. Кравцова
кандидат биологических наук, доцент Ю.В. Скибо
научный сотрудник. С.Н. Абрамов

С 23 Сборник тезисов 3-й Всероссийской школы-конференции «Биохимия –
основа наук о жизни», посвященной памяти профессора В.Г. Винтера. –
Казань: Казанский федеральный университет, 2024. – 99 с.

УДК 579
ББК 28

В сборнике представлены тезисы участников 3-й Всероссийской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биохимия – основа наук о жизни», приуроченной к 85-летию юбилею профессора В.Г. Винтера, который длительное время являлся заведующим кафедрой биохимии Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина, и, благодаря трудам которого, были заложены основные биохимические, молекулярно-генетические и фармакологические направления научных исследований, которые успешно развиваются сотрудниками кафедры и ее выпускниками во многих российских и зарубежных университетах и институтах.

В сборнике представлены тезисы по шести секциям: биохимия и молекулярная биология канцерогенеза, молекулярные механизмы программируемой клеточной гибели, молекулярные основы медицинской биохимии, молекулярные механизмы наследственных заболеваний, биоинформатика, биотехнология и бионанотехнология.

Содержание

Секция 1

«Биохимия и молекулярная биология канцерогенеза»

<i>Ахунзянов А.А., Золотых М.З., Мифтахов Р.Р., Ризванов А.А.</i> Исследование влияния длительной гипоксии на сферообразование клеток солидных опухолей <i>in vitro</i>	8
<i>Баязитова А.Д., Бондарь О.В., Пугачев М.В., Штырлин Ю.Г.</i> Генерация активных форм кислорода в опухолевых клетках под действием пиридоксинсодержащих производных доксорубина	9
<i>Бродецкая М.А., Зеленихин П.В., Шурпик Д.Н.</i> Пиллар[5]арены как перспективная основа для создания систем таргетной доставки противоопухолевых агентов класса фторпиримидинов	11
<i>Бугаенко Т.А., Киямова Р.Г., Булатова Л.Ф.</i> Распознавание эпитопа MX35 натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b при аминокислотной замене T329/330M	13
<i>Гилязова Э.М., Валиуллина А.Х., Давлетишин Д.Р., Булатов Э.Р.</i> Анализ влияния активаторов p53 на уровень лигандов NKG2D в опухолевых клетках с различным статусом p53	14
<i>Ильина А.М., Левашов И.С., Килунов А.В., Попутский М.А., Рябин А.А., Киямова Р.Г., Скрипова В.С.</i> Определение аминокислотных последовательностей переменных доменов и границ гипервариабельных участков мышиных моноклональных антител, направленных против натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b	17
<i>Килунов А.В., Решетникова Д.Д., Скрипова В.С., Матросова Д.С., Киямова Р.Г., Богданов М.В.</i> Разработка метода определения количества дисульфидных связей в большом внеклеточном домене натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b	19
<i>Колесова Е.С., Тохтуева М.Д., Мелехин В.В., Чунтонова М.С., Абрамов В.М., Ельцов О.С.</i> Комплексы платины(II) с неапоптотическим механизмом подавления роста неопластических клеток и описание противоопухолевой активности соединений платины(IV), полученных на их основе	22
<i>Морозова П.С., Хафизова Э.М., Львова А.Ю., Надырова А.И., Дудкина Е.В., Ульянова В.В.</i> Оценка функциональной активности опухоль-специфичного промотора гена BIRC5	24

<i>Парамонова А.В., Тохтуева М.Д., Мелехин В.В., Ляпустин Д.Н., Марусич И.В., Котовская С.К., Русинов В.Л.</i>	
Исследование противоопухолевой активности аминопроизводных азоло[1,5-а]пиримидинов на культивируемых опухолевых клетках	26
<i>Попутский М.А., Фирсова Д.А., Килунов А.В., Булатова Л.Ф., Киямова Р.Г., Скрипова В.С.</i>	
Создание панели клеточных линий карциномы яичника OVCAR-8, стабильно экспрессирующих мутантные варианты натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b	28
<i>Ратушный А.Ю., Матвеева Д.К., Ездакова М.И., Каширина Д.Н.</i>	
Паракринная активность сенесцентных иммортализованных мезенхимных стромальных клеток	30
<i>Рябин А.А., Ильина А.М., Левашов И.С., Килунов А.В., Киямова Р.Г., Скрипова В.С.</i>	
Создание рекомбинантных векторов для получения гуманизированных антител против натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b	31

Секция 2

«Молекулярные механизмы программируемой клеточной гибели»

<i>Абрамова З.И.</i>	
Программируемая клеточная гибель: значение процесса для биомедицины	34
<i>Вологин Д.С., Пономарева А.А., Дмитриева С.А.</i>	
Хлорид лития индуцирует аутофагию в тканях печени	36
<i>Саидгараева М.Г., Городилова А.В., Абдрахманова И.И., Филин И.Ю., Чернов В.М., Ризванов А.А., Соловьева В.В.</i>	
Применение генно-модифицированных стволовых клеток, экспрессирующих индуцирующий апоптоз лиганд TRAIL в противоопухолевой терапии на моделях глиобластомы человека <i>in vitro</i>	38
<i>Тихонова А.Н., Бурцева А.В., Афанасьева З.И., Абрамова З.И.</i>	
Влияние окислительного стресса на активность киназы mTOR в CD4+ Т-лимфоцитах при аутоиммунном тиреоидите	40

Секция 3

«Молекулярные основы медицинской биохимии»

<i>Нгомси С.С., Закирьянова Г.Ф., Петров А.М.</i>	
Модуляторные свойства оксида азота в функционировании Na ⁺ /Ca ²⁺ -обменника в нервно-мышечном синапсе мышцы	43
<i>Cyrille A. VODOUNON, Gabin A. DOSSO, Haziz A. O. SIN</i>	
Evaluation of the antimicrobial efficacy and toxicity of <i>Ageratum conyzoides</i> L. used in the traditional treatment of vaginal infections in southern-Benin	45

<i>Cyrille A. VODOUNON, Hachim R.B I. MAMADOU, Gabin A. DOSSOU, Haziz SINA, Lamine BABA-MOUSSA</i>	
Skin disorders due to Panton-Valentine leucocidin-producing <i>Staphylococcus aureus</i> : profile and immunological follow-up of patients in peri-urban Benin	46
<i>Ахметова А.А., Фаттахова А.Н.</i>	
Спектрофотометрический метод анализа флуоксетина	47
<i>Беляев Г.П., Выштакалюк А.Б., Парфенов А.А., Галяметдинова И.В., Семенов В.Э., Зобов В.В.</i>	
Изменение молекулярных маркеров воспаления при профилактике и лечении экспериментального фиброза печени крысы	49
<i>Бурцева А.В., Тихонова А.Н., Тихомирова М.В., Абрамов С.Н., Абрамова З.И.</i>	
Изучение механизма действия рапамицина на регуляцию иммунного ответа при тиреоидите Хашимото	51
<i>Ганеева Л.А., Скибо Ю.В.</i>	
Анализ некоторых показателей специфического иммунитета защитных функций слюны	53
<i>Ибрагимов Б.Р., Демерцидис А.С., Скибо Ю.В., Тихомирова М.В., Абрамов С.Н., Решетникова И.Д., Абрамова З.И.</i>	
Измерение выработки активных форм кислорода LC3-ассоциированного фагоцитоза в моноцитах больных бронхиальной астмой	54
<i>Квон А.И., Сыромятникова В.Ю., Гомзикова М.О.</i>	
Оценка влияния цитохалазин-индуцированных микровезикул на миграцию и пролиферацию эпителиальных клеток почки <i>in vitro</i>	56
<i>Коровина М.О., Ю.В. Филина, Хаертынов К.С., Габдулхакова А.Г.</i>	
Анализ циторегуляторных свойств серологически активных антигенов микобактерий	57
<i>Насыбуллина Э.И., Тимофеева А.В., Гарифуллина А.А., Ахметзянова Э.Р.</i>	
Характеристика первичной культуры микроглии, выделенной из коры головного мозга новорожденных крысят	60
<i>Павлов А.Е., Тяпкина О.В.</i>	
Уровень продукции малонового диальдегида в диафрагмальной мышце мышцей после моделируемой гипогравитационной разгрузки и реадаптации	61
<i>Павлова Е.К., Самарцев В.Н.</i>	
Модификация нигерицином механизма разобщающего действия литохоловой кислоты в митохондриях печени	63
<i>Топчу Ю.А., Бычков И.Н., Абрамова З.И., Булатов Э.Р., Бумбер Я.А.</i>	
Роль гистон-метилтрансферазы NSD1 в регуляции онкогенной передачи сигналов при ВПЧ-негативной плоскоклеточной карциноме головы и шеи	64
<i>Шаурбина А.М., Геращенко К.Г., Ибрагимова М.Я.</i>	
Влияние лиганда адренорецепторов ницерголина на содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в клетках органов мышцей	66

Секция 4

«Молекулярные механизмы наследственных заболеваний»

Петров С.В.

Свинец как индивидуальный фактор риска повышенного уровня ревматоидного фактора у лиц с наследственной предрасположенностью к ревматоидному артриту

67

Секция 5

«Биоинформатика»

Власенкова Р.А., Филюшина К.И., Киямова Р.Г.

Анализ сетей взаимодействия гена *SLC34A2* и генов, отвечающих за гликозилирование белков человека, в нормальных и опухолевых тканях яичника

69

Коснырев А.С., Лугинская С.А., Ульянова В.В.

Оценка ингибирующей активности белка YrdF *Bacillus pumilus* в отношении рибонуклеаз патогенных микроорганизмов *in silico*

71

Халилов В.Р.

Биоинформатическое моделирование как инструмент в оптимизации индивидуальных профилактических программ по предотвращению миопии у детей

72

Секция 6

«Биотехнология и бионанотехнология»

Бульмакова Д.С., Сокольникова Л.В., Сулейманова А.Д.

Бактериальные штаммы *Pantoea brentneri* в качестве биопрепаратов для защиты растений

74

Ганеева И.А., Змиевская Е.А., Булатов Э.Р.

Получение и характеристика микровезикул из индуцированных Т-регуляторных клеток

75

Гаршина Д.Ю., Пусенкова Л.И., Ласточкина О.В.

Механизмы снижения послеуборочных болезней *Solanum tuberosum* L. эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* в композиции с салициловой кислотой: роль вторичных метаболитов с антимикробной активностью

77

Губайдуллина А.А., Каюмова Б.Р., Царегородцева Т.С., Шаршакова А.А., Шаймарданова А.А.

Сравнение эффективности трансдукции клеточных культур человека аденоассоциированными вирусами разных серотипов

78

<i>Змиевская Е.А., Булатов Э.Р.</i> Влияние искусственных везикул из CAR-Тклеток на клетки опухолевых линий РС3М и А431	79
<i>Ишмухаметов И.Р. Фахруллина Г.И., Чередниченко Ю.В.</i> Иммобилизация лизоцима на поверхности каолина и монтмориллонита	82
<i>Каюмова Б.Р., Царегородцева Т.С., Губайдуллина А.А., Шаршакова А.А., Шаймарданова А.А.</i> Создание генетически модифицированных клеток для восстановления активности β -гексозаминидазы А	83
<i>Охотникова А.Н., Осипова И.В.</i> Влияние температуры и времени гидролиза на степень гидролиза белков мясного полуфабриката	84
<i>Сыромятникова В.Ю., Квон А.И., Гомзикова М.О.</i> Оценка влияния цитохалазин-индуцированных микровезикул на миграционную и пролиферативную активность дермальных фибробластов человека <i>in vitro</i>	86
<i>Сырчина Н.Г., Петрова Н.В.</i> Получение рекомбинантного лектина льна семейства Legume в растительной системе экспрессии	87
<i>Царегородцева Т.С., Губайдуллина А.А., Каюмова Б.Р., Шаршакова А.А., Шаймарданова А.А.</i> Анализ уровня ферментативной активности арилсульфатазы А в клетках НЕК293 после генетической модификации с помощью рекомбинантного аденоассоциированного вируса	89
<i>Шаршакова А.А., Шаймарданова А.А., Ибрахим Ахмад, Каюмова Б.Р., Царегородцева Т.С., Губайдуллина А.А., Соловьева В.В., Ризванов А.А.</i> Кросс-коррекция дефицита β -гексозаминидазыА с использованием генетически модифицированных мезенхимальных стволовых клеток человека в культуре клеток пациента с болезнью Тея-Сакса	90
<i>Агафонова Л.Е., Жданов Д.Д., Вахрушев И.В., Ярыгин К.Н., Шумянцева В.В.</i> Клеточные и ДНК-сенсоры для исследования биохимических процессов	92
<i>Богомазов А.А., Золотых М.А., Филина Ю.В., Рахматуллина А.Р., Булыгина Е.А., Гимранов А.М., Мифтахова Р.Р.</i> Анализ компонентов опухолевой стромы у пациентов с раком молочной железы на основе РНК секвенирования единичных клеток	95
<i>Миндубаев А.З., Бабынин Э.В.</i> Белый фосфор и его мутагенные свойства	97

Секция 1
«Биохимия и молекулярная биология канцерогенеза»

УДК: 616-006.04

**Исследование влияния длительной гипоксии на сферообразование клеток
солидных опухолей *in vitro***

А.А. Ахунзянов¹, М.З. Золотых¹, Р.Р. Мифтахова¹, А.А. Ризванов^{1,2}

E-mail: AAAhunzyanov@kpfu.ru

¹*Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия*

²*Академия наук Республики Татарстан, г. Казань, 420013, Россия*

Введение. Стволовые опухолевые клетки (СОК) – это относительно небольшая субпопуляция опухолевых клеток, обуславливающая способность опухоли к метастазированию. Именно СОК вызывают рецидивы заболевания и развитие устойчивости к лучевой и химиотерапии [1]. Гипоксия или снижение концентрации кислорода характерно для многих солидных опухолей и развивается вследствие нарушения кровообращения и пролиферации опухолевых клеток. Гипоксия играет важную роль в поддержании фенотипа СОК и метастазировании опухоли [2]. На основании этих данных была поставлена цель: оценить влияние длительной гипоксии на популяцию СОК6 клеточных линий (SNB-19, HCT116, MCF-7, MDA-MB-231, NCI-H460 и PC-3), полученных из образцов 5 различных типов солидных опухолей.

Материалы и методы. Для оценки влияния условий гипоксии (2% O₂) и нормоксии (21% O₂) на субпопуляцию стволовых опухолевых клеток 6 клеточных линий солидных опухолей использовался функциональный тест на сферообразование. Анализ количества и среднего диаметра образующихся опухолевых сфероидов проводился на 14-й день инкубации в бессывороточной среде. Влияние концентрации кислорода на экспрессию антигена ядер пролиферирующих клеток PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) и транскрипционного фактора NANOG оценивалось с использованием метода иммуноблоттинга. Для анализа доли СОК с высокой альдегиддегидрогеназной активностью (ALDH⁺) использовался метод проточной цитофлуориметрии.

Результаты. В условиях длительной гипоксии наблюдалось ингибирование сферообразования СОК линий аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 и предстательной железы PC-3. Также условия хронической гипоксии приводили к уменьшению диаметра опухолевых сфероидов и снижению пролиферации в 5 клеточных линиях: SNB-19, HCT116, MDA-MB-231, NCI-H460 и PC-3. В опухолевых сфероидах линий клеток NCI-H460 и PC-3 данный эффект сопровождался снижением уровня экспрессии маркера пролиферации PCNA. Выявлено увеличение ALDH⁺-клеток MCF-7 после 48 ч и снижение после 7 дней инкубации в условиях гипоксии.

Заключение. Условия длительной гипоксии ингибируют сферообразование СОК предстательной железы линии PC-3, вызывая снижение уровня PCNA,

который играет важную роль в репликации ДНК и пролиферации клеток. Обнаружено увеличение доли СОК с высокой альдегиддегидрогеназной активностью после 48 ч и снижение при длительной гипоксии (7 дней). Таким образом, эффект кислородного голодания на СОК зависит от продолжительности, тяжести гипоксического стресса и конкретной нозологии.

Ключевые слова: гипоксия, стволовые опухолевые клетки, сферообразование клеток, маркеры пролиферации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №22-74-10115) согласно Программе стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

1. Soltanian S., Matin M. M. Cancer stem cells and cancer therapy // Tumor Biology. – 2011. – V. 32. – P. 425–440.
2. Zhang C., Samanta D., Lu H., Bullen J.W., Zhang H., Chen I., He X., Semenza G.L. Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m6A-demethylation of NANOG mRNA // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2016. – V. 113. – №. 14. – P. E2047-E2056.

УДК: 577.181.5

Генерация активных форм кислорода в опухолевых клетках под действием пиридоксинсодержащих производных доксорубина

А.Д. Баязитова, О.В. Бондарь, М.В. Пугачев, Ю.Г. Штырлин

E-mail: Liya.me018@gmail.com

Научно-образовательный центр фармацевтики, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008, Россия

Введение. Антрациклиновые антибиотики, в особенности доксорубин, широко применяются в химиотерапии благодаря их свойству эффективно подавлять пролиферацию опухолевых клеток. Механизм действия доксорубина заключается в интеркаляции между азотистыми основаниями, формировании аддуктов с ДНК и ингибировании топоизомеразы II. Это приводит к торсионному стрессу и дестабилизации нуклеосом, что запускает апоптоз. Доксорубин также генерирует активные формы кислорода (АФК), что объясняется его метаболическими превращениями до нестабильной формы семихинона и/или действием на митохондрии [1]. Доксорубин является высокотоксичным соединением и вызывает тяжелые побочные эффекты, такие как кардиотоксичность и супрессия костного мозга [1]. С целью снижения побочных эффектов были синтезированы новые производные доксорубина, в которых фрагмент молекулы пиридоксина (витамина В6) присоединен к доксорубину посредством пептидной связи. Производное доксорубина с длиной линкера С3 безопасно для условно-нормальных клеток человека, по индексу селективности оно в 20 раз превосходит

доксорубицин. Предполагается, что механизм действия новых производных связан с увеличением продукции АФК в опухолевых клетках. Целью работы является анализ генерации АФК в опухолевых клетках под действием производных доксорубина, а также визуализация внутриклеточной локализации соединений.

Материалы и методы. Клетки аденокарциномы молочной железы MCF-7 культивировали 3 сут в присутствии малотоксичных (до IC₄₀) концентраций производных доксорубина. Далее суспензию клеток окрашивали индикатором АФК –H₂DCF-DA (2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат) и анализировали на проточном цитофлуориметре. Для изучения внутриклеточной локализации флуоресцентных производных доксорубина применяли конфокальную микроскопию с окрашиванием ядра (Hoechst 33342) и митохондрий (Родамин 123).

Результаты. Установлено, что обработка клеток MCF-7 пиридоксинсодержащими производными доксорубина сопровождается увеличением содержания АФК в клетках в 1,45–1,67 раза относительно контроля. Конфокальная микроскопия показала, что новые более безопасные производные, в отличие от доксорубина, не проникают в ядра клеток и не взаимодействуют с ДНК [2], а локализуются в цитоплазме, в значительной степени их локализация совпадает с локализацией клеточных митохондрий.

Заключение. Пиридоксинсодержащие производные доксорубина генерируют АФК в клетке, и это может являться одним из основных механизмов действия данных соединений. Генерация АФК может быть обусловлена повреждающим действием соединений на митохондрии, являющиеся основным депо АФК в клетке.

Ключевые слова: генерация АФК, производные доксорубина, проточная цитофлуориметрия, конфокальная микроскопия.

Работа выполнена при поддержке субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету на выполнение государственного задания в сфере научной деятельности (проект № FZSM-2023-0010).

1. Carvalho C., Santos R.X., Cardoso S., Correia S., Oliveira P.J., Santos M.S., Moreira P.I. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect // Current Medicinal Chemistry. – 2009. – V. 16 (25) – P. 3267 – 3285.
2. Karwt R., Bondar O.V., Pugachev M.V., Mohammad T., Kadyrova A.S., Pavelyev R.S., Alrhoun S., Gnezdilov O.I., Shtyrilin Y.G. Anticancer Potential of Pyridoxine-Based Doxorubicin Derivatives: An In Vitro Study // Life. – 2024. – V. 14 (3) – P. 282.

УДК: 577.1

Пиллар[5]арены как перспективная основа для создания систем таргетной доставки противоопухолевых агентов класса фторпиримидинов

М.А. Бродецкая, П.В. Зеленихин, Д.Н. Шурник

E-mail: margaritabma02@gmail.com

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Проблема роста заболеваемости раком в последние десятилетия становится все более актуальной. По данным Всемирной организации здравоохранения, только в 2022 году было зарегистрировано 20 млн новых случаев рака и 9.7 млн случаев смерти от онкологических заболеваний [1].

Химиотерапия, будучи высокоэффективной в лечении многих видов рака, имеет ряд существенных недостатков, начиная от тяжелых побочных эффектов и заканчивая серьезными системными нарушениями. Так, применение фторпиримидинов, третьих по популярности противоопухолевых агентов, существенно ограничено их высокой кардиотоксичностью [2, 3]. Решением данной проблемы может стать таргетная доставка цитотоксического агента непосредственно в локус опухоли. Перспективной платформой для создания подобных систем являются пиллар[n]арены [4]. Уникальная столбчатая структура этих молекул, обеспечивающая высокую симметричность и жесткость их гидрофобной полости, дает им ряд преимуществ перед другими макроциклами [5]. Кроме того, с помощью методов электронной спектроскопии поглощения в УФ и видимой области спектра установлена способность пиллар[5]аренов взаимодействовать со фторпиримидинами в стехиометрическом соотношении 1:1 или 2:1. Целью настоящей работы стала оценка собственных цитотоксических свойств пиллар[5]аренов AUI-298 и AUI-330, а также ряда фторпиримидинов по отношению к малигнизированным и немалигнизированным клеткам. Полученные результаты позволят судить о возможностях дальнейшего комплексного исследования этих соединений.

Материалы и методы. В работе были исследованы наиболее популярные противоопухолевые агенты класса фторпиримидинов: 5-фторурацил, 5-флуксуридин и тегафур. Деказамещенные образцы пиллар[5]аренов: AUI-298, AUI-330, отличающиеся боковыми заместителями, были любезно предоставлены группой проф. д.х.н. И.И. Стойкова (Химический институт имени А.М. Бутлерова, КФУ). Оценка цитотоксического действия исследуемых веществ проводилась на культурах клеток аденокарциномы лёгкого человека A549 и эпителиальных клеток лёгкого эмбриона коровы LEK с помощью МТТ-теста *in vitro*. Данный метод колориметрической оценки метаболической активности клеток был выбран в связи с его широкой популярностью, доступностью и высокой воспроизводимостью результатов [6].

При проведении статистической обработки данных был использован непараметрический критерий Манна – Уитни, так как распределение показателей жизнеспособности клеток было неравномерным.

Результаты. Показано, что фторпиримидины достоверно ингибируют жизнеспособность клеток A549 и LEK в диапазоне исследованных концентраций:

5-фторурацил (0.1–100 мкг/мл), 5-флоксуридин (0.001–10 мкг/мл), тегафур (15–500 мкг/мл). Концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) данных веществ для раковых клеток A549 составила 10.98, 0.49 и 561.28 мкМ для 5-фторурацила, 5-флоксуридина и тегафура соответственно. Для немалигнизированных клеток LEK этот показатель оказался в несколько раз ниже и составил 0.93, 0.003 и 179.24 мкМ соответственно, что свидетельствует о более высокой токсичности агентов фторпирими-динового ряда для клеток нормальных тканей в сравнении с клетками карцином, что согласуется с данными литературы.

Пиллар[5]арены, в свою очередь, проявили схожие профили цитотоксической активности как для раковых, так и для немалигнизированных клеток. При этом AUI-298, содержащий остатки меркаптопурина в качестве заместителей, проявил значительно более высокую цитотоксичность, характеризующуюся показателями IC_{50} , равными 1.7 и 2.8 мкМ для A549 и LEK соответственно. AUI-330, содержащий остатки тиоглюкозы в качестве заместителей, проявил цитотоксичность лишь в диапазоне значительно более высоких концентраций: 600 и 700 мкМ соответственно. Это делает данный макроцикл более перспективной платформой для конструирования систем таргетной доставки фторпиримидинов с точки зрения биосовместимости.

Заключение. Полученные результаты обосновывают перспективность дальнейших исследований биологической активности комплексных препаратов на основе функционализированных пиллар[5]аренов и фторпиримидинов, поскольку поля их токсической активности находятся в пересекающихся концентрационных диапазонах. Установление данного факта было необходимо для продолжения дальнейших исследований, поскольку взаимодействие пиллар[5]аренов и фторпиримидиновых цитостатиков происходит в эквимолярных количествах.

Ключевые слова: пиллар[5]арены, культура клеток, метаболическая активность.

1. Ferlay J., Ervik M., Lam F., Colombet M., Mery L., Piñeros M. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer // World Health Organisation. – 2020. – <https://gco.iarc.fr/today/en> – 29.03.2024.
2. Layoun M. E., Wickramasinghe C.D., Peralta M.V., Yang E.H. Fluoropyrimidine-induced cardiotoxicity: Manifestations, mechanisms, and management // *Curr. Oncol.Rep.* – 2016. – V. 18. – P. 35.
3. Peng H., Xie B., Yang X., Dai J., Wei G., He Y. Pillar[5]arene-based, dual pH and enzyme responsive supramolecular vesicles for targeted antibiotic delivery against intracellular MRSA // *Chem. Commun.* – 2020. – V. 56. – P. 8115 – 8118.
4. Ogoshi T., Yamagishi T. Pillar[5]- and pillar[6]arene-based supramolecular assemblies built by using their cavity-size-dependent host–guest interactions // *Chem. Commun.* – 2014. – V. 50. – P. 4776–4787.
5. Kakuta T., Yamagishi T., Ogoshi T. Stimuli-Responsive Supramolecular Assemblies Constructed from Pillar[n]arenes // *Acc. Chem. Res.* – 2018. – V. 51. – P. 1656.
6. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay // *J. Immunol. Meth.* – 1983. – V. 65. – P. 55 – 63.

Распознавание эпитопа MX35 натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b при аминокислотной замене T329/330M

Т.А. Бугаенко, Р.Г. Киямова, Л.Ф. Булатова

E-mail: tavady10@gmail.com

Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Рак яичника (РЯ) характеризуется высокой смертностью из-за поздней диагностики и ограниченной эффективности существующих методов лечения. Преодоление этой проблемы возможно с помощью применения таргетной терапии, основанной на идентификации специфических мишеней, экспрессируемых на поверхности опухолевых клеток. Мембранный гликопротеин, натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b (*SLC34A2*) является мишенью для моноклональных антител, которые направлены против эпитопа MX35 (311–340 а.о.), входящего в состав большого внеклеточного домена (ВКД) [1]. Благодаря повышенной экспрессии в клетках РЯ и других опухолей, эпитоп MX35 является привлекательной мишенью для таргетной терапии на основе моноклональных антител (мАт). Ранее было установлено, что замена р.Т330V в белке NaPi2b нарушает способность мАт распознавать эпитоп MX35 [2]. Мы предполагаем, что замена треонина в положении 329/330 (в зависимости от изоформы белка) на метионин также может препятствовать эффективному распознаванию эпитопа MX35 соответствующими антителами. Таким образом, целью данной работы является создание генетической конструкции, кодирующей транспортер NaPi2b с заменой р.Т329/330M, для изучения распознавания эпитопа MX35 мАт L3(28/1) в Вестерн-блот анализе.

Материалы и методы. Для проведения сайт-направленного мутагенеза мы заменили триплет, кодирующий треонин в положении 329/330 гена *SLC34A2*, на триплет, кодирующий метионин. Полученный ПЦР-продукт амплифицировали в клетки *E. coli* штамма *NovaBlue*с последующим выделением плазмидной ДНК. Мутацию подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру. Плазмидную ДНК с целевой мутацией трансфицировали в клетки РЯ OVCAR-8 и получали осветленную фракцию лизатов. Распознавание эпитопа MX35 мутантной формы NaPi2b_T329/330M по сравнению с NaPi2b дикого типа проводили в Вестерн-блот анализе антителами L3(28/1) [3]. Для подтверждения содержания NaPi2b в трансфицированных клетках OVCAR-8 использовали мАт против N-концевого домена транспортера N-NaPi2b (15/1) [4].

Результаты. В результате работы мы получили генетический конструктор со вставкой гена *SLC34A2*, кодирующего мутантный вариант NaPi2b с заменой T329/330M. С помощью Вестерн-блот анализа антителами N-NaPi2b (15/1) подтвердили экспрессию мутантной формы NaPi2b_T329/330M и NaPi2b дикого типа в лизатах трансфицированных клеток OVCAR-8. Результаты Вестерн-блот

анализа антителами L3(28/1) показали, что эпитоп MX35 не распознается в мутантной форме NaPi2b_T329/330M по сравнению с NaPi2b дикого типа.

Заключение. Мы показали, что замена р. T329/330M в области ВКД NaPi2b приводит к недоступности эпитопа MX35 для антител L3(28/1). Это может означать, что пациенты с онкологией, которые являются носителями мутации р. T329/330M, не будут чувствительны к противоопухолевой терапии на основе моноклональных антител против эпитопа MX35. Полученные данные позволят в будущем выявить когорту пациентов, для которых терапия моноклональными антителами против NaPi2b будет менее эффективной, а также разработать более персонализированные схемы лечения больных с онкологией.

Ключевые слова: транспортер NaPi2b, сайт-направленный мутагенез, Вестерн-блот анализ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-75-01100.

1. Yin B.W.T., Kiyamova R., Chua R. et al. Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas // Cancer Immun. – 2008. – V. 8. – P. 3.
2. Gryshkova V.S. Creation of cellular models for the analysis of sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b, a potential marker for ovarian cancer // Biopolymers and Cell. – 2009. – V. 25. – № 2. – P. 95–100
3. Kiyamova, R., Gryshkova, V., Ovcharenko, G. et al. Development of Monoclonal Antibodies Specific for the Human Sodium-dependent Phosphate Co-transporter NaPi2b // Hybridoma. – 2008. – V. 27. – № 4. – P. 277–284.
4. Gryshkova V., Lituiev D., Savinska L. et al. Generation of monoclonal antibodies against tumor-associated antigen MX35 sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b // Hybridoma (Larchmt). – 2011. – V. 30. – №1. – P. 37–42.

УДК: 577

Анализ влияния активаторов p53 на уровень лигандов NKG2D в опухолевых клетках с различным статусом p53

Э.М. Гилязова, А.Х. Валиуллина, Д.Р. Давлетишин, Э.Р. Булатов

E-mail: elvina281097@mail.ru

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. NKG2D представляет собой активирующий рецептор, который связывается с лигандами MICА/В и ULBP1-6, обычно индуцируемыми на поврежденных, онкотрансформированных или инфицированных клетках и опосредующими их уничтожение.

Согласно литературным данным p53 может оказывать регуляторный эффект на лиганды NKG2D, например, влиять на изменение уровня экспрессии ULBP1/2[1]. Известно, что p53 способен стимулировать иммунный ответ за счет индукции секреции цитокинов и других провоспалительных факторов, к тому же

реактивация мутантного p53 способна приводить к гибели опухолевых клеток путем запуска апоптоза [2].

Усиление экспрессии лигандов NKG2D способствует более эффективному распознаванию опухолевых клеток анти-NKG2DCAR-Т-клетками и последующей элиминации. Комбинация активаторов p53 (дикого и мутантного) и NKG2DCAR-Т-клеток позволит взаимно усилить комбинированный противоопухолевый эффект этих двух видов терапии, сохранив при этом высокую специфичность.

Материалы и методы. В работе использовали следующие клеточные линии: MCF7 p53^{wt}, MCF7 p53^{-/-}, Huh7 p53^{Y220C} и трансдуцированная клеточная линия Huh7 p53^{Y220C} (MicA+, ULBP+). В качестве активаторов p53 в работе использовали коммерческое низкомолекулярное соединение APR-246, а также разработанное коллективом соединение JC36 (производное (1H-пиррол-1-ил) индазола).

Анализ жизнеспособности клеток проводился методом колориметрического МТТ-теста. Для этого клетки были обработаны веществом JC36 в диапазоне концентраций от 0 до 100 мкМ, веществом APR-246 – от 0 до 40 мкМ. В качестве отрицательного контроля служили клетки, обработанные ДМСО в концентрации 1%. Полученные данные обрабатывали в программе GraphPadPrism 8: строили графики зависимости жизнеспособности клеток (%) от логарифма концентраций веществ и рассчитывали концентрации IC50.

Методом ПЦР в режиме реального времени оценивали влияние соединений APR-246 и JC36 на изменение уровня экспрессии транскрипционных мишеней белка p53 (*CDKN1A*(p21), *MDM2*, *BBC3*), в качестве референсного гена использовали ген *ACTB*. Данные анализировали с помощью программного обеспечения CFXManager (Bio-Rad). Все реакции проводили в трех повторностях. Относительную нормализованную экспрессию рассчитывали методом Пфаффа $\Delta\Delta C_t$. Оценку изменения уровня лигандов NKG2D после обработки активаторами проводили методом проточной цитометрии на цитометре FACSAriaIII (BDBioscience).

Для определения изменения уровня экспрессии генов методом ПЦР и уровня лигандов методом проточной цитометрии клетки обрабатывали соединениями APR-246 в концентрации 10 мкМ, JC36 в концентрации 30 мкМ и культивировали в течение 24 ч.

Результаты. Полуингибирующие концентрации вещества JC36 для указанных клеточных линий находятся в диапазоне концентраций от 11 до 46 мкМ, примечательно, что для клеточных линий с мутацией p53 концентрации IC50 ниже, чем для клеточных линий с диким и нокаутным типом. Диапазон полуингибирующих концентраций соединения APR-246 составил от 4 до 21 мкМ.

В клеточной линии MCF7 p53^{wt} относительный уровень мРНК генов *CDKN1A*, *MDM2* и *BBC3* достоверно повышался после обработки JC36 по сравнению с контрольным образцом, обработанным ДМСО. В то время как при обработке клеточной линии MCF7 p53^{wt} APR-246 происходило достоверное снижение относительного уровня мРНК гена *BBC3*.

В клеточной линии MCF7 p53^{-/-} под действием JC36 происходило достоверное повышение относительного уровня мРНК генов *CDKN1A* и *BBC3* по сравнению с контрольным образцом, обработанным ДМСО. Под действием APR-246

происходило достоверное снижение уровня мРНК генов *MDM2* и *BBC3*. В клеточной линии Huh7 p53^{Y220C} под действием JC36 происходило достоверное повышение относительного уровня мРНК гена *CDKN1A* (p21), *MDM2* и *BBC3* относительно контрольных образцов, обработанных ДМСО. Под действием вещества APR-246 происходило достоверное снижение уровня мРНК генов *CDKN1A* (p21) и *BBC3* по сравнению с контрольными образцами.

В модифицированной клеточной линии Huh7p53^{Y220C}(MicA+ULBP+) происходило достоверное повышение уровня мРНК гена *CDKN1A* (p21) и *BBC3* под действием JC36 и уровня гена *BBC3* под действием APR-246. Относительный уровень мРНК гена *MDM2* достоверно снижался под действием APR-246.

Таким образом, выявлено отсутствие влияния APR-246 и JC36 на изменение поверхностного уровня NKG2D лигандов клеточных линий MCF7p53^{-/-} и Huh7p53^{Y220C}. Однако, стоит отметить тенденцию к повышению уровня MicA лиганда до 10,2% в клеточной линии MCF7p53^{wt} после обработки APR-246 по сравнению с контрольными клетками, обработанными ДМСО. Также показано снижение уровня ULBP в клеточной линии MCF7p53^{wt} после обработки APR-246 в два раза, по сравнению с контрольными клетками, обработанными ДМСО. В клеточной линии Huh7p53^{Y220C}(MicA+ULBP+) выявлено снижение уровня MicA лиганда с 49,9% до 14,8% после обработки APR-246 по сравнению с контрольными клетками, обработанными ДМСО.

Заключение. Полученные результаты указывают на перспективность соединения JC36 для усиления активности p53, мутантного или дикого, без негативного влияния на экспрессию лигандов NKG2D, что важно для распознавания опухолевых клеток NKG2D CAR-T-клетками. Дифференциальные эффекты APR-246 требуют дальнейшего изучения. Исследование демонстрирует потенциал комбинирования активаторов p53 с NKG2D CAR-T-клетками в терапии солидных опухолей с различным статусом p53.

Ключевые слова: активаторы p53, МТТ-тест, культуры клеток.

Работа выполнена за счет гранта РФФИ 22-74-10076.

1. Zingoni A., Molfetta R., Fionda C., Soriani A., Paolini R., Cipitelli M., Cerboni C., Santoni A. NKG2D and Its Ligands: "One for All, All for One" // *Front Immunol.* – 2018. – V. 12. (9). – P. 476.
2. Liu Y, Leslie PL, Zhang Y. Life and Death Decision-Making by p53 and Implications for Cancer Immunotherapy // *Trends Cancer.* – 2021. – V. 7. – P. 226–239.

Определение аминокислотных последовательностей переменных доменов и границ гиперпеременных участков мышинных моноклональных антител, направленных против натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b

А.М. Ильина, И.С. Левашов, А.В. Килунов, М.А. Попутский, А.А. Рябин, Р.Г. Киямова, В.С. Скрипова

E-mail: aleks.ilyina.15@gmail.com

Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Моноклональные антитела (мАт) широко применяются в медицине, в частности для лечения и диагностики онкологических заболеваний [1,2]. Перспективной мишенью для противоопухолевой терапии является натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b, повышенная экспрессия которого наблюдается при раке яичника, легких, щитовидной железы, молочной железы и других видах рака [3,4]. В настоящее время за рубежом представлены несколько экспериментальных конъюгатов антител с противоопухолевыми препаратами, распознающих транспортер NaPi2b, которые исследуются для лечения рака яичника [5,6]. В НИЛ «Биомаркер» КФУ впервые в России создан ряд мышинных моноклональных антител против транспортера NaPi2b, которые могут лечь в основу разработки отечественных препаратов для диагностики и лечения онкологических заболеваний, включая рак яичника.

Важным аспектом разработки лекарственных препаратов на основе антител является снижение иммуногенности мАт животного происхождения путем их гуманизации методами генной инженерии [7]. Для создания рекомбинантных гуманизированных антител, сохраняющих специфичность, но не вызывающих иммунного отторжения у человека, необходимо определение аминокислотных последовательностей переменных доменов и границ гиперпеременных участков лёгких и тяжёлых цепей исходных антител. Знание характеристик переменных участков также позволяет строить модели взаимодействий антитело-антиген *in silico* и оптимизировать последовательности переменных доменов антител для улучшения их терапевтических свойств [8]. Целью данной работы является определение аминокислотных последовательностей переменных доменов и границ гиперпеременных участков лёгких и тяжёлых цепей, полученных мышинных мАт, направленных против натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b, для их дальнейшей гуманизации.

Материалы и методы. В работе использовали метод синтеза кДНК со смесной матрицы (SMART), адаптированный для определения последовательностей транскриптов, кодирующих переменные домены легких (VL) и тяжелых (VH) цепей мышинных мАт [9]. Для этого общую РНК из гибридомных клеток, продуцирующих мышинные мАт против транспортера NaPi2b, выделяли с помощью реагента

ExtractRNA («Евроген», Россия). Синтез кДНК и ПЦР-амплификацию транскриптов VL и VH исследуемых мАт проводили с использованием набора реагентов Mint («Евроген», Россия) и праймеров, комплементарных константным доменам мышинных мАт и содержащих адапторы для последующего секвенирования последовательностей ампликонов [10]. Продукты ПЦР анализировали с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле и очищали из геля с использованием набора Cleanup Mini («Евроген», Россия). Для дальнейшего секвенирования полученные продукты ПЦР клонировали в плазмиду pAL2-T при помощи набора для ТА-клонирования Quick-TA kit («Евроген», Россия) с последующей трансформацией клеток *E. coli* штамма XL1-Blue и отбором рекомбинантных клонов с помощью бело-голубой селекции и ПЦР-скрининга. Рекомбинантные клоны использовали для получения ночных культур и выделения из них плазмидной ДНК с использованием коммерческого набора Plasmid Miniprep («Евроген», Россия). Полученные рекомбинантные плазмиды секвенировали по методу Сэнгера. Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с помощью ресурса IgBLAST для определения процента их идентичности эталонным последовательностям IgBLAST и исключения aberrантных последовательностей легких цепей типа каппа, которые могут синтезироваться гибридными клетками. Границы гипервариабельных участков определяли с помощью ресурсов Geneious Biologics и SAbPred.

Результаты. Для каждого исследуемого мышинного мАт было получено как минимум четыре рекомбинантные плазмиды pAL2-T, содержащие кДНК, кодирующие вариабельные домены их легких и тяжелых цепей, последовательности которых были определены с помощью секвенирования по Сэнгеру. Анализ полученных последовательностей с помощью ресурса IgBLAST показал не менее 95 % идентичности вариабельных доменов легких и тяжелых цепей для всех анализируемых мышинных мАт. Это указывает на большую вероятность того, что полученные последовательности действительно являются последовательностями вариабельных доменов антител. С помощью ресурсов Geneious Biologics и SAbPred были определены границы гипервариабельных участков анализируемых антител.

Заключение. Полученная информация о нуклеотидных и аминокислотных последовательностях вариабельных доменов легких и тяжелых цепей мышинных мАт против натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b может быть использована для создания их гуманизированных вариантов и разработки на их основе новых таргетных противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: моноклональные антитела, вариабельные домены, синтез кДНК со сменой матрицы SMART.

Работа выполнена при инфраструктурной поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

1. Castelli M.S., McGonigle P., Hornby P.J. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies // Pharmacol Res Perspect. – 2019. – V. 7 (6).

2. Kothari M., Wanjari A., Acharya S., Karwa V., Chavhan R., Kumar S., Kadu A., Patil R. A Comprehensive Review of Monoclonal Antibodies in Modern Medicine: Tracing the Evolution of a Revolutionary Therapeutic Approach // Cureus. – 2024. – V. 16(6).
3. Yin B.W., Kiyamova R., Chua R., Caballero O.L, Gout I., Gryshkova V., Bhaskaran N., Souchelnytskyi S., Hellman U., Filonenko V., Jungbluth A.A., Odunsi K., Lloyd K.O., Old L.J., Ritter G. Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas // Cancer Immun. – 2008. – V. 8. (3).
4. Kiyamova R., Shyian M., Lyzogubov V.V., Usenko V.S., Gout T., Filonenko V. Immunohistochemical analysis of NaPi2b protein (MX35 antigen) expression and subcellular localization in human normal and cancer tissues // Exp. Oncol. – 2011. – V. 33. – P. 157–161.
5. Attinger-Toller I., Probst P., Kallenberger L., Renard E., Bertrand R., Fay R., Santimaria R., Maurhofer P., Grabulovski D., Schlereth B., Spycher P.R. LB124 / 12 - Targeting NaPi2b with a novel dual TOP1i ADC that shows excellent biophysical properties and high efficacy in vivo / American Association for Cancer Research. April 9, 2024. URL: <https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/20272/presentation/10590>
6. Petersen M.E., Brant M.G., Lasalle M., Das S., Duan R., Wong J., Ding T., Wu K.J., Siddappa D., Fang C., Zhang W., et al. Design and Evaluation of ZD06519, a Novel Camptothecin Payload for Antibody Drug Conjugates // Mol Cancer Ther. – 2024. – V. 23(5) – P. 606–618.
7. Chiu M.L., Goulet D.R., Teplyakov A., Gilliland G.L. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics // Antibodies (Basel). – 2019. – V. 8(4). – P. 55.
8. Sela-Culang I., Kunik V., Ofra Y. The structural basis of antibody-antigen recognition // Front Immunol. - 2013. – V.4 – P. 302.
9. Schmidt W.M., Mueller M.W.. CapSelect: a highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs // Nucleic Acids Res. – 1999. – V. 27. (21).
10. Meyer L., López T., Espinosa R., Arias C. F, Vollmers C, DuBois R. M. A simplified workflow for monoclonal antibody sequencing // PLoS One. – 2019. – V. 14.(6).

УДК: 577.112.4

**Разработка метода определения количества дисульфидных связей
в большом внеклеточном домене натрий-зависимого фосфатного
транспортера NaPi2b**

**А.В. Килунов¹, Д.Д. Решетникова^{1,2}, В.С. Скрипова¹, Д.С. Матросова¹,
Р.Г. Киямова¹, М.В. Богданов^{1,2}**

E-mail: kilunov73@gmail.com

¹Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт
фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский)
федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

²Отдел биохимии и молекулярной биологии, Медицинская школа Макговерна,
Университет Техасского центра медицинских наук, Хьюстон, 77030, США

Введение. Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b является перспективной мишенью для диагностики и терапии злокачественных новообразований моноклональными антителами [1,2]. В области большого внеклеточного домена (ВКД) транспортера NaPi2b находится эпитоп MX35, который распознается терапевтическими антителами преимущественно в опухолевых клетках, но

не в клетках нормальных тканей, где также наблюдается экспрессия транспортера [3]. Было показано, что доступность эпитопа MX35 для распознавания моноклональными антителами в опухолевых клетках зависит от дисульфидных связей между остатками цистеина C303, C322, C328 и C350 в области ВКД транспортера NaPi2b [4–6]. Мы предполагаем, что в условиях опухолевого микроокружения, для которого характерны гипоксия и пониженное значение pH, происходит образование определенного паттерна дисульфидных связей, которые приводят к формированию уникальной конформации ВКД транспортера NaPi2b, при которой эпитоп MX35 становится доступным для распознавания моноклональными антителами. Однако сколько именно дисульфидных связей и между какими остатками цистеина в области ВКД транспортера NaPi2b они образуются, остается неизвестным. Одним из методов для определения свободных или участвующих в образовании дисульфидной связи остатков цистеина является химическая модификация тиоловых групп тиол-специфичным высокомолекулярным метоксиполиэтиленгликоль малеимидом-5000 (mPEG-Mal-5000) в условиях с восстановлением дисульфидной связи нетиоловым восстанавливающим агентом трис (2-карбоксиэтил) фосфин гидрохлоридом (ТСЕР) и без него [7]. Поскольку в аминокислотной последовательности транспортера NaPi2b остатки цистеина встречаются не только в области ВКД, но и других доменах, необходимо подобрать такие условия, при которых для химической модификации будут доступны только остатки цистеина в области ВКД, что позволит в дальнейшем изучать особенности формирования дисульфидных связей, от которых зависит доступность эпитопа MX35 для антител в интактных клетках, у которых целостность плазматической мембраны не должна быть нарушена. В связи с этим целью данной работы является подбор условий химической модификации тиоловых групп остатков цистеина в большом внеклеточном домене транспортера NaPi2b малеимид-содержащими и восстанавливающими соединениями.

Материалы и методы. Интактные клетки рака яичника OVCAR-4, эндогенно экспрессирующие транспортер NaPi2b, или полученный из клеток лизат, обрабатывали реагентом mPEG-Mal-5000 (5 кДа) в условиях с восстановлением дисульфидных связей реагентом ТСЕР и без него. Успешная модификация каждой тиоловой группы приводит к увеличению молекулярной массы модифицируемого белка на 5 кДа и, как следствие, изменению его электрофоретической подвижности. Модификацию остатков цистеина оценивали по изменению электрофоретической подвижности транспортера NaPi2b в клеточных лизатах методом Вестерн-блот анализа антителами против его N-концевого домена.

Результаты. Было показано, что при обработке лизата клеток OVCAR-4 реагентом mPEG-Mal-5000 при восстановлении дисульфидных связей агентом ТСЕР и без него происходит увеличение молекулярной массы транспортера со 100 кДа (без модификации) до 180 и 250 кДа после модификации соответственно. Полученный результат указывает на то, что происходит модификация тиоловых групп не только четырех остатков цистеина в составе ВКД, но и в других доменах транспортера NaPi2b, например, в его внутриклеточном С-концевом домене.

В связи с этим, были отработаны условия модификации с использованием живых клеток OVCAR-4, в которых для химической модификации доступны остатки цистеина только ВКД на их поверхности. Обработка интактных клеток OVCAR-4 реагентом mPEG-Mal-5000 без восстановления дисульфидных связей агентом ТСЕР не приводит к изменению молекулярной массы транспортера NaPi2b, что говорит об отсутствии свободных для модификации тиоловых групп остатков цистеинов в области ВКД транспортера NaPi2b. Предварительное восстановление дисульфидных связей приводит к увеличению молекулярной массы транспортера NaPi2b примерно на 20 кДа, что свидетельствует о модификации четырех остатков цистеина в области ВКД. Полученные данные говорят о том, что все четыре остатка цистеина в области ВКД транспортера NaPi2b вовлечены в образование двух дисульфидных связей. Таким образом, для анализа особенностей формирования дисульфидных связей в области ВКД транспортера NaPi2b, для химической модификации необходимо использовать живые клетки, в которых целостность плазматической мембраны должна сохраняться.

Заключение. Подобранные условия модификации тиоловых групп остатков цистеина в составе большого внеклеточного домена транспортера NaPi2b позволят определить, между какими остатками цистеина образуются дисульфидные связи, при которых эпитоп MX35 становится доступным для распознавания антителами. Полученные данные будут способствовать более глубокому пониманию динамических структурных изменения мембранных белков в опухолевых клетках.

Ключевые слова: транспортер NaPi2b, большой внеклеточный домен, дисульфидные связи, Вестерн-блот анализ.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 23–15-00456, <https://rscf.ru/project/23-15-00456/> и при инфраструктурной поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

1. Horsley E., Jabeen A., Veillard N., et al. Preclinical development of NaPi2b- PL2202, a novel camptothecin-based antibody-drug conjugate targeting solid tumors expressing NaPi2b // Cancer Res. – 2024. – V. 84(6). – P. 5085–5085.
2. Fessler, S., Dirksen, A., Collins, S. D. et al. XMT-1592, a Site-specific Dolasynthen-Based NaPi2b-Targeted Antibody-Drug Conjugate for the Treatment of Ovarian Cancer and Lung Adenocarcinoma // Cancer Res. – 2020. – V. 80(16). –P. 2894–2894.
3. Gryshkova V., Goncharuk I., Gurtovyy V., Khozhayenko Y., Nespryadko S., Vorobjova L., Usenko V., Gout I., Filonenko V., Kiyamova R. The study of phosphate transporter NaPi2b expression in different histological types of epithelial ovarian cancer // Exp. Oncol. – 2009. – V. 31(1). – P. 37–42.
4. Bulatova L. et al. Toward a Topology-Based Therapeutic Design of Membrane Proteins: Validation of NaPi2b Topology in Live Ovarian Cancer Cells // Frontiers in Molecular Biosciences. – 2022. – V. 9. – P. 895911.
5. Kiyamova R., Minigulova L., Skripova V., Nurgalieva A., Reshetnikova D., Savinska L., et al. 34P N-Glycosylation Status of Membrane Phosphate Transporter NaPi2b Is Crucial for its Epitope

Recognition by Monoclonal Antibody in Tumour Cells // Ann. Oncol. – 2020. – V. 31. – P. 1227–1228.

6. Bulatova L.F., Skripova V., Nurgalieva A., Reshetnikova D., Savenkova D. V., Timonina A., et al. 26P Structurally Constrained Tumor-specific Epitope within the Largest Extracellular Domain of Sodium-dependent Phosphate Transporter NaPi2b // Ann. Oncol. – 2021. – V. 32. – P. 368–369.

7. McKinnon L. J., Fukushima J., Endow J.K. et al. Membrane chaperoning of a thylakoid protease whose structural stability is modified by the protonmotive force // Plant Cell – 2020. – V. 32. (5). – P. 1589-1609.

УДК:57.085.23

Комплексы платины(II) с неапоптотическим механизмом подавления роста неопластических клеток и описание противоопухолевой активности соединений платины(IV), полученных на их основе

**Е.С. Колесова¹, М.Д. Тохтуева¹, В.В. Мелехин^{1,2}, М.С. Чунтонова¹,
В.М. Абрамов¹, О.С. Ельцов¹**

E-mail: elizaveta.kolesova23@mail.ru

¹Уральский федеральный университет имени первого Президента России
Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия

²Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург, Россия

Введение. В лечении онкологических заболеваний возникают следующие проблемы: химиорезистентность, повышенная токсичность применяемых препаратов и сложность доставки лекарств через гематоэнцефалический барьер, например, при злокачественных новообразованиях головного мозга [1, 2]. В связи с этим существует необходимость в разработке и анализе новых противоопухолевых соединений с низкой молекулярной массой, повышенной эффективностью и низкой токсичностью. На данный момент большой интерес представляют комплексные соединения платины. Перспективным направлением является синтез комплексов платины(IV), которые обладают рядом преимуществ по сравнению с комплексами платины(IV), – повышенная липофильность, лучшая стабильность и меньшая токсичность [3, 4]. На основании этих данных была поставлена цель: изучить влияние новых соединений платины(IV), на жизнедеятельность культивируемых опухолевых клеток человека и сравнить их с оказываемым эффектом ранее синтезированного комплекса платины(II) [5].

Материалы и методы. Анализ общей цитотоксичности *in vitro* на клетках карциномы легкого A549, карциномы печени HepG2, глиобластомы A172 и T98G и почки эмбриона человека HEK-293 проводили с помощью МТТ-теста. Оценку апоптоза осуществляли с использованием метода, основанного на двойном флуоресцентном окрашивании клеток аннексином V-FITC и пропидием йодидом (PI) (G1511, Wuhan Servicebio Technology Co., Ltd., Китай) после инкубации клеток с исследуемыми соединениями в течение 72 ч. Пролиферативную активность клеток оценивали с помощью набора для анализа клеточной пролиферации Click-iT

EdU-555 (G1602, Wuhan Servicebio Technology Co., Ltd., Китай). Клетки инкубировали с исследуемыми соединениями в концентрациях равных значениям IC_{50} в течение 24 ч, после чего в пробы вносили раствор EdU в концентрации 10 μM и инкубировали 2 ч. Определение трансмембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) митохондрий проводили с использованием красителя JC-1 (G1515-100T, Wuhan Servicebio Technology Co., Ltd., Китай), который вносили к клеткам после 72-часовой инкубации клеток с соединениями в концентрациях равных значениям IC_{50} . Окрашивание красителем JC-1 проводили в течение 30 мин при 37 °C, 5% CO_2 и 98% влажности в темноте. Изучение продукции активных форм кислорода в живых клетках проводили с использованием флуоресцентного красителя H_2DCFDA (Lumiprobe, Россия) в двух параллелях, первая – с соединением в концентрации IC_{50} и с антиоксидантом N-ацетил-L-цистеином (NAC) (Dia-m, Russia) в рабочей концентрации 3 mM, вторая – с соединением в концентрации IC_{50} без антиоксиданта. Изучение перекисного окисления кардиолипина в митохондриях живых клеток проводили с использованием флуоресцентного красителя MitoCLOx (Lumiprobe, Россия), который вносили к клеткам после 72-часовой инкубации клеток с соединениями в концентрациях равных значениям IC_{50} . Окрашивание проводили в течение 60 мин при 37 °C, 5% CO_2 и 98% влажности в темноте.

Результаты. Синтезированный хлор платиновый(II) комплекс 6-(4-((2-этилгексил)окси)фенил)-2,2'-бипиридина обладает выраженной противоопухолевой активностью, в особенности, против клеток линии A172 (глиобластома человека). Комплекс выражено подавляет жизнедеятельность опухолевых клеток A172 и A549, в то время как нормальные клетки линии НЕК-293 сохраняют свою жизнеспособность на более высоком уровне. Также было установлено, что он действует по отличному от цисплатина механизму действия и является индуктором окислительного стресса и перекисного окисления липидов. Исследуемые соединения комплекса платины(IV) оказывают более выраженный цитотоксический эффект против клеток глиобластомы (A172), чем комплекс платины(II). При этом значение IC_{50} для одного из исследуемых соединений в случае клеток глиобластомы ниже, чем на линии нормальных клеток почки эмбриона человека НЕК-293. Соединения комплекса платины(IV) проявили активность не только в отношении клеток карциномы легкого (A549), но и в отношении клеток гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2). Однако, несмотря на более выраженный противоопухолевый эффект, исследуемые соединения комплекса платины(IV) оказали и большую цитотоксичность в отношении нормальных клеток почки эмбриона человека НЕК-293, чем комплекс платины(IV).

Закключение. Полученные результаты показывают актуальность поиска новых комплексных соединений платины(IV). Высокая цитотоксичность в отношении таких клеточных линий, как A172 и HepG2, делает их перспективными противоопухолевыми агентами не только в потенциальном лечении опухолей головного мозга, но и опухолей печени.

Ключевые слова: соединения платины, цитотоксичность, активные формы кислорода, МТТ-тест.

1. Mitusova K., Peltek O.O., Karpov T.E., Muslimov A.R., Zyuzin M.V., Timin A.S. Overcoming the blood–brain barrier for the therapy of malignant brain tumor: current status and prospects of drug delivery approaches // J Nanobiotechnol. – 2022. – V. 20 (412).
2. Ebrahimi Shahmabadi H., Movahedi F., Esfahani M. K. M., Alavi S.E., Eslamifar A., Anaraki G.M., Akbarzadeh A. Efficacy of Cisplatin-loaded polybutyl cyanoacrylate nanoparticles on the glioblastoma // Tumor Biol. – 2014. – V. 35. – P. 4799 – 4806.
3. Патент №2666898 Российская Федерация, МПК C07F 15/00(2006.01), A61K 31/282(2006.01), A61K 35/00(2006.01). Комплексы платины (IV) с повышенной противораковой эффективностью: № 2017109142: заявл. 03.09.2014: опубл. 13.09.2018 / Кисилка В., Менглер Я., Гавловиц К., Кацер П., Цервены Л. – 18 с.
4. Tan Y., Chen H., Zhang J., Cai L., Jin S., Song D., Yang T., Guo Z., Wang X. Platinum (IV) complexes as inhibitors of CD47-SIRPα axis for chemoimmunotherapy of cancer // Eur J Med Chem. – 2022. – V. 229 (114047).
5. Tokhtueva M.D., Melekhin V.V., Abramov V.M., Ponomarev A.I., Prokofyeva A.V., Grzhegorzhevskii K.V. The arylbipyridine platinum (II) complex increases the level of ROS and induces lipid peroxidation in glioblastoma cells // Biometals. – 2024.

УДК: 577.218+577.29+615.277

Оценка функциональной активности опухоль-специфичного промотора гена BIRC5

П.С. Морозова, Э.М. Хафизова, А.Ю. Львова, А.И. Надырова,
Е.В. Дудкина, В.В. Ульянова

E-mail: polinam0r0zz@yandex.ru

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Несмотря на достижения, достигнутые в лечении злокачественных заболеваний, смертность от онкологии продолжает расти. При этом основной проблемой противоопухолевых препаратов является их низкая селективность, приводящая к развитию системной токсичности [1]. Генная терапия – один из инновационных подходов в лечении рака, основанный на введении терапевтических генов в соматические клетки пациента с целью направленного изменения генных дефектов или придания клеткам новых свойств [2]. Современные подходы генотерапии рака позволили достичь строгой избирательности действия противоопухолевых генетических конструкций благодаря использованию опухоль-специфичных промоторов, контролирующих экспрессию терапевтических генов. Одним из таких многообещающих промоторов является промотор гена BIRC5 - сурвивина, активный в 85% известных опухолей, в особенности в клетках рака молочной железы и легких, при этом в нормальных клетках активность промотора минимальна [3]. В связи с этим целью данной работы явилась оценка функциональной активности и специфичности промотора гена BIRC5.

Материалы и методы. Для изучения активности промотора гена BIRC5 на первом этапе была создана репортерная конструкция на основе беспромоторного вектора pTurboGFP-PRL (Евроген, Россия), несущего ген флуоресцентного белка

TurboGFP. Промотор гена сурвивина амплифицировали с плазмиды pDrive-hSurvivin (Invivogen, США). Далее с использованием реагента PEI40K созданной репортерной конструкцией pTurboSurvivin-GFP трансфицировали клеточные линии аденокарциномы легкого человека A549, рака шейки матки HeLa, клетки аденокарциномы протоков молочной железы MCF-7 (ATCC, США) и клетки фибробластов легких эмбриона человека WI-38 (ИНЦ РАН Россия). Специфичность и активность промотора анализировали в ходе флуоресцентного анализа на микроскопе Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Германия), оценивая интенсивность свечения репортерного гена зеленого флуоресцентного белка TurboGFP в трансфицированных клетках в голубом спектре (480 нм) на протяжении 24–72 ч культивирования.

Результаты. В ходе работы максимальный уровень свечения репортерного белка TurboGFP детектировался на 48 ч культивирования во всех опухолевых линиях, что подтверждает функциональную активность промотора гена сурвивина. При этом наибольшая транскрипционная активность промотора была обнаружена в клетках MCF-7. В опухолевых клетках A549 и HeLa на протяжении всего эксперимента детектировалось слабое свечение белка TurboGFP, в клетках WI-38 флуоресценция практически не обнаруживалась, что говорит о низкой активности работы промотора гена BIRC5 в нормальных клетках.

Заключение. В ходе работы была создана репортерная генетическая конструкция pTurboSurvivin-GFP, несущая ген зеленого флуоресцентного белка TurboGFP под контролем опухоли-специфичного промотора гена BIRC5. На ее основе подтверждена функциональная активность исследуемого промотора и его специфичность. Показано, что промотор гена сурвивина максимально активен в клетках рака груди MCF-7, при этом в опухолевых клетках A549 и HeLa, а также в нормальных клетках WI-38 активность промотора снижена. Высокая специфичность и активность промотора гена BIRC5 исключительно в опухолевых клетках определенного происхождения делают его важной мишенью для разработки на его основе противоопухолевых терапевтических конструкций высокой избирательности действия.

Ключевые слова: генотерапия рака, генетические конструкции, промотор гена BIRC5.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» («Приоритет-2030»).

1. Dembic Z. Antitumor Drugs and Their Targets // Molecules. – 2020. – V. 25 (23).
2. Singh V., Khan N., Jayandharan G.R. Vector engineering, strategies and targets in cancer gene therapy//Cancer gene therapy. – 2022. – V. 29 (5). – P. 402 – 417.
3. Martínez-Sifuentes M.A., Bassol-Mayagoitia S., Nava-Hernández M.P., Ruiz-Flores P., Ramos-Treviño J., Haro-Santa Cruz J., Hernández-Ibarra J.A. Survivin in Breast Cancer: A Review. // Genet Test Mol Biomarkers. – 2022. – V. 26 (9). – P. 411– 421.

Исследование противоопухолевой активности аминопроизводных азоло[1,5-а] пиримидинов на культивируемых опухолевых клетках человека

**А.В. Парамонова¹, М.Д. Тохтуева¹, В.В. Мелехин^{1,2}, Д.Н. Ляпустин¹,
И.В. Марусич¹, С.К. Котовская¹, В.Л. Русинов¹**

E-mail: a.v.paramonova@urfu.ru.

¹Уральский федеральный Университет имени первого президента России

Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия

²Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург, Россия

Введение. Онкологические заболевания – вторая по распространенности причина смертности в мире [1]. Как известно, злокачественные новообразования характеризуются высоким уровнем риска развития резистентности, а современные противоопухолевые препараты часто вызывают множество побочных эффектов. Поэтому актуален поиск новых противоопухолевых препаратов, которые позволили бы избежать возникновения резистентности и обладали бы низкой токсичностью для пациентов. В последние десятилетия производные азолопиримидинов зарекомендовали себя как перспективные противоопухолевые агенты [2, 3].

На основании всех этих данных была поставлена цель: изучить влияние новых азоло[1,5-а]пиримидинов на жизнедеятельность культивируемых опухолевых клеток человека, а именно провести оценку активности клеточного деления, индукции апоптоза, влияния на потенциал митохондриальной мембраны ($\Delta\Psi_m$), а также оценить морфологические изменения клеток. Полученные данные позволяют судить о перспективности исследуемого класса соединений в качестве потенциальных противоопухолевых агентов.

Материалы и методы. Общую цитотоксичность исследуемых соединений определяли на клетках эмбриональной рабдомиосаркомы (Rd), карциномы легкого (A549), карциномы печени (HepG-2) и почки эмбриона человека (HEK-293) с помощью МТТ-теста. Активность клеточной пролиферации оценивали с помощью окрашивания флуоресцентным зондом iF555 после суточного воздействия на клетки Rd исследуемым соединением и двухчасовой инкубации с 5-этинил-2-дезоксинуридином (EdU) (Click-iT EdU-555, Wuhan Servicebio Technology Co., Ltd., Китай). Индукцию апоптоза определяли путем окрашивания клеток рабдомиосаркомы смесью аннексина V-FITC (G1511, Wuhan Servicebio Technology Co., Ltd., Китай) и пропидия йодида после инкубации с исследуемыми соединениями в течение 72 ч. Потенциал мембраны митохондрий оценивали с использованием красителя JC-1 (G1515-100T, Wuhan Servicebio Technology Co., Ltd., Китай). Проведена оценка действия наиболее перспективного соединения на внутриклеточные сигнальные пути для выявления возможных биологических мишеней с использованием информационных технологий. Уровень экспрессии белков определяли с помощью вестерн-блоттинга и иммуноферментного анализа, оценку морфологических изменений – окрашиванием по методу Романовского – Гимза.

Результаты. По результатам МТТ-теста установили, что исследуемое соединение обладает выраженным противоопухолевым эффектом против клеток рабдомиосаркомы, при этом остается нетоксичным в отношении нормальных клеток почки эмбриона человека. Окрашивание клеток Rd зондом iF555 после инкубации с EdU позволило установить снижение активности репликации ДНК и, как следствие, деления клеток после их инкубации с исследуемым соединением по сравнению с интактной пробой. Цисплатин, использовавшийся в данном случае как положительный контроль, почти полностью заблокировал репликацию. В результате окрашивания культуры линии Rd специфическим белком аннексином V-FITC и пропидием йодидом наблюдали незначительное количество клеток, находящихся в раннем апоптозе и погибших клеток, как последствия на них исследуемым соединением, так и цисплатином. При этом важно отметить, что общее количество клеток в пробах с веществами было значительно снижено в сравнении с интактной группой в результате замедления их деления, что согласуется с данными предыдущих экспериментов. Окрашивание клеток эмбриональной рабдомиосаркомы специфическим красителем JC-1 позволило установить отсутствие влияния на потенциал митохондриальной мембраны ($\Delta\Psi_m$) после воздействия на линию Rd исследуемым соединением, в то время как цисплатин индуцировал падение потенциала примерно в 2 раза. Выявленные в результате молекулярного докинга мишени прошли экспериментальную проверку *in vitro*. В результате окрашивания клеточной культуры Rd красителем Романовского – Гимзы наблюдалось сильное изменение морфологических свойств клеток после воздействия на них исследуемым соединением.

Заключение. Исследуемое соединение оказывает влияние на выявленные в результате молекулярного докинга биологические мишени, снижая при этом их активность, выраженным цитостатическим эффектом, при этом в отличие от цисплатина не вызывает блокировки репликации ДНК, активизации механизмов апоптоза и снижения потенциала митохондриальной мембраны ($\Delta\Psi_m$). Полученные результаты подтверждают перспективность поиска новых противоопухолевых агентов среди исследуемого класса соединений.

Ключевые слова: противоопухолевые агенты, цитотоксичность, молекулярный докинг, вестерн-блоттинг, иммуноферментный анализ.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования № 075-03-2023-006 от 16.01.2023 (номер темы FEUZ-2023-0021).

1. Aberoumandi S.M., Mohammadhosseini M., Abasi E., Saghati S., Nikzamir N., Akbarzadeh A., Panahi Y., Davaran S. An update on applications of nanostructured drug delivery systems in cancer therapy: a review // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* – 2017. – V. 45. – P. 1–11.
2. Safari F., Bayat M., Nasri S., Karami. Synthesis and evaluation of anti-tumor activity of novel triazolo[1,5-a] pyrimidine on cancer cells by induction of cellular apoptosis and inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition process // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2020. – V. 30. – P. 127111.
3. Huo J.-L., Wang S., Yuan X.-H., Yu B., Zhao W., Liu H.-M. Discovery of [1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidines derivatives as potential anticancer agents // *Eur. J. Med. Chem.* – 2020. – V.211. – P. 113108.

Создание панели клеточных линий карциномы яичника OVCAR-8, стабильно экспрессирующих мутантные варианты натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b

М.А. Попутский, Д.А. Фирсова, А.В. Килунов, Л.Ф. Булатова, Р.Г. Киямова, В.С. Скрипова

E-mail: poputskii@mail.ru

Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Таргетная терапия является более эффективным и безопасным подходом для лечения онкологических заболеваний по сравнению с химиотерапией, поскольку воздействует именно на клетки опухоли, что минимизирует проявление нежелательных побочных явлений у пациента. Поиск новых молекулярных терапевтических мишеней, характерных именно для клеток опухоли, и изучение их особенностей, является важной задачей для разработки новых таргетных противоопухолевых препаратов. Одной из таких мишеней является мембранный гликопротеин натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b, повышенная экспрессия которого наблюдается в ряде опухолей, включая рак яичника и легкого [1, 2]. Интересной особенностью транспортера NaPi2b является то, что его большой внеклеточный домен (ВКД) содержит эпитоп MX35, который распознается антителами преимущественно в опухолевых клетках, но не в клетках нормальных тканей, экспрессирующих транспортер [3, 4]. Известно, что доступность эпитопа MX35 для антител зависит от наличия дисульфидных связей между остатками цистеина С303, С322, С328 и С350 в области его ВКД [5], однако, сколько и между какими именно остатками цистеина они формируются, на данный момент неизвестно. Таким образом, эпитоп MX35 представляет особый интерес для изучения механизма обеспечения его доступности для антител и разработки направленных против него таргетных противоопухолевых препаратов.

В связи с этим целью данной работы стало создание панели клеточных линий карциномы яичника OVCAR-8, стабильно экспрессирующих дикий тип или мутантные варианты транспортера NaPi2b, в которых остатки цистеина в положениях С303, С322, С328 и С350, либо одновременно два из них (С303 и С322, С303 и С328, С322 и С328), заменены на остатки аланина. Полученные клеточные линии могут быть использованы для определения того, между какими остатками цистеина образуются дисульфидные связи в области ВКД транспортера NaPi2b, от которых зависит доступность эпитопа MX35 для антител.

Материалы и методы. Клеточную линию карциномы яичника человека OVCAR-8, в которой отсутствует эндогенная экспрессия гена транспортера NaPi2b, трансдуцировали лентивирусными частицами, кодирующими рекомбинантные дикий тип или мутантные варианты транспортера NaPi2b с одиночными и двойными заменами остатков цистеина С303, С322, С328 и С350 на остатки

аланина. После отбора с помощью селективного антибиотика пурамицина (Thermo Fisher Scientific, США) успешно трансдуцированные клетки использовали для получения клональных сублиний методом редкого посева [6]. Подтверждение экспрессии рекомбинантного транспортера NaPi2b в полученных клональных сублиниях и отбор сублиний для включения в панель проводили методами дот-блоттинга и Вестерн-блоттинга антителами против N-концевого домена транспортера NaPi2b (CST, США).

Результаты. Было получено от 4 до 39 клональных сублиний клеток карциномы яичника OVCAR-8, успешно трансдуцированных лентивирусными частицами, кодирующими рекомбинантные транспортер NaPi2b дикого типа или его мутантные варианты с одиночными (p.C303A, p.C322A, p.C328A, p.C350A) и двойными (p.C303A+C322A, p.C303A+C328A, p.C322A+C328A) заменами остатков цистеина на остатки аланина в области ВКД. На основе результатов дот-блоттинга и Вестерн-блоттинга для включения в клеточную панель было отобрано по одной клональной сублинии с лучшим уровнем экспрессии исследуемых рекомбинантных вариантов транспортера NaPi2b. Таким образом, в состав клеточной панели вошли 8 клональных сублиний карциномы яичника OVCAR-8, стабильно экспрессирующие рекомбинантный транспортер NaPi2b дикого типа и его мутантные варианты с одиночными и двойными заменами остатков цистеина на остатки аланина в области ВКД.

Заключение. Полученная панель клеточных линий может быть использована для изучения особенностей образования дисульфидных связей между остатками цистеина C303, C322, C328 и C350, обеспечивающих формирование конформации ВКД транспортера NaPi2b, при которой эпитоп MX35 становится доступным для антител. Это, в свою очередь, поможет раскрыть механизмы образования «скрытых» эпитопов мембранных белков на поверхности опухолевых клеток, что откроет новые возможности для разработки новых противоопухолевых таргетных препаратов.

Ключевые слова: транспортер NaPi2b, большой внеклеточный домен, дисульфидные связи, клеточные линии, трансдукция.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 23-15-00456, <https://rscf.ru/project/23-15-00456/> и при инфраструктурной поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

1. Homann V., Rosin-Steiner S., Stratmann T. et al. Sodium-phosphate cotransporter in human salivary glands: Molecular evidence for the involvement of NPT2b in acinar phosphate secretion and ductal phosphate reabsorption // Arch Oral Biol – 2005. – V. 50 (9). – P. 759 – 68.
2. Nishimura M., Naito S. Tissue-specific mRNA Expression Profiles of Human Solute Carrier Transporter Superfamilies // Drug Metab Pharmacokinet – 2008. – V.23 (1). – P. 22 – 44.
3. Fessler, S., Dirksen, A., Collins, S. D. et al. XMT-1592, a Site-specific Dolasynthen-Based NaPi2b-Targeted Antibody-Drug Conjugate for the Treatment of Ovarian Cancer and Lung Adenocarcinoma // Cancer Res – 2020. – V. 80. (16). – P. 2894 – 2894.

4. Bodyak, N.D., Mosher, R., Yurkovetskiy, A.V. et al. The Dolaflexin-Based Antibody-Drug Conjugate XMT-1536 Targets the Solid Tumor Lineage Antigen SLC34A2/NaPi2b // *Mol Cancer Ther.* – 2021. – V. 20. (5). – P. 896 – 905.
5. Минигулова Л.Ф., Скрипова В.С., Нургалиева А.К. и др. Распознавание натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами N-NaPi2b в клетках карциномы яичника // *Учен.зап. Казан.ун-та. Сер. Естеств. Науки* – 2020. – V. 162. (4). – P. 529 – 540.
6. Скрипова В.С. Получение стабильных клеточных линий млекопитающих, экспрессирующих гены рекомбинантных белков: учебно-методическое пособие / В.С. Скрипова, Л.Ф. Булатова, А.К. Нургалиева, Д.Д. Савенкова, А.А. Чуманова, Р.Г. Киямова. – Казань: Издательство Казанского университета, 2023. – 33 с.

УДК: 576.32/.36

**Паракринная активность сенесцентных иммортализованных
мезенхимальных стромальных клеток**

А.Ю. Ратушный, Д.К. Матвеева, М.И. Ездакова, Д.Н. Каширина

E-mail: ratushkin@mail.ru.

*ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, г. Москва,
123007, Россия*

Введение. Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) выполняют ключевую регуляторную функцию во всех тканях человеческого организма. При активации клеточного старения, вызванного множественными делениями или сублетальным воздействием, их физиологические характеристики могут значительно измениться, что влияет на их регуляторные свойства и может способствовать, в том числе, канцерогенезу. Одним из основных механизмов клеточной коммуникации является паракринное взаимодействие [1, 2]. В данной работе мы проанализировали изменения в секреторном профиле МСК, вызванные активацией клеточного старения с помощью противоопухолевого препарата митомицина С (МмС), который применяется в медицине.

Результаты. МмС добавлялся на 18 ч с концентрацией 1,5 мкг/мл, а анализ проводился через 10 дней после его удаления. Были зафиксированы морфофункциональные изменения, характерные для клеточного старения. Показатели FSC-A/SSC-A (размер/гранулярность) увеличились, а аутофлуоресценция возросла, что указывает на накопление липофусцина. Пролиферативная активность полностью прекратилась. Экспрессия β -галактозидазы, связанная со старением, обнаруживалась почти в 100% клеток. В целом эти изменения соответствуют результатам, полученным на модели репликативного старения, однако проявляются более выражено. При помощи гистологических красителей Sirius Red и Fast Green исследовали внеклеточный матрикс (ВКМ) МСК. Для МмС⁺ клеток продукция коллагеновых и неколлагеновых белков была

снижена. Содержание про-коллагена 1 α 1 в кондиционированной среде уменьшилось в 10 раз. Анализ экспрессии генов подтвердил снижение продукции ВКМ сенесцентными МСК. Экспрессия коллагена 1 типа, эластина и фибронектина у сенесцентных МСК снизилась более чем в 2 раза, в то время как уровень коллагеназы MMP1 увеличился в 3 раза. Также было замечено достоверное увеличение CTGF в экстракте дцВКМ, тогда как содержание VEGF снижалось. Анализ протеома при помощи масс-спектрометрии выявил снижение продукции структурных компонентов ВКМ и повышение содержания ферментов, участвующих в его деградации.

Для оценки содержания цитокинов в кондиционированной среде был применен мультиплексный анализ. Обработка МмС приводит к значительному увеличению продукции GM-CSF, G-CSF и MIP-1 α . Концентрация MCP-3, IL-6, GRO α и FGF-2 возросла более чем в 2 раза, в то время как уровни FLT-3L, IP-10 и IL-5 снизились. Для исследования изменений на транскрипционном уровне использовался количественный ПЦР-анализ. Обработка МмС более чем в 2 раза усиливает транскрипционную активность 24 генов (включая *IL1B*, *IL1A*, *CSF2*, *IL11*, *LIF*, *CXCL1* и др.) и снижает активность 13 генов (таких как *PTN*, *IGF1*, *NRG2* и др.).

Заключение. Таким образом, данные указывают на снижение продукции структурных компонентов ВКМ и усиление его деградации. Показано изменение паракринного профиля МСК при воздействии МмС и активации клеточного старения.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, активация клеточного старения, секреторный профиль, митомицин С, мультиплексный анализ, количественный ПЦР-анализ.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 21-75-10117.

1. Lunyak V.V., Amaro-Ortiz A., Gaur M. Mesenchymal stem cells secretory responses: Senescence messaging secretome and immunomodulation perspective // Front. Genet. – 2017. – V. 8. – P. 220.
2. Turinetto V., Vitale E., Giachino C. Senescence in human mesenchymal stem cells: Functional changes and implications in stem cell-based therapy // Int. J. Mol. Sci. – 2016. – V. 17. – P. 1164.

УДК: 573.6

Создание рекомбинантных векторов для получения гуманизированных антител против натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b

А.А. Рябин, А.М. Ильина, И.С. Левашов, А.В. Килунов, Р.Г. Киямова, В.С. Скрипова

E-mail: alexryabin001@gmail.com

Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b является мембранным гликопротеином, поддерживающим гомеостаз фосфатов в организме [1]. Его повышенное содержание выявлено в ряде опухолей, включая карциному яич-

ника [2]. Мембранная локализация делает транспортер NaPi2b перспективной мишенью для разработки таргетных противоопухолевых препаратов, в том числе на основе моноклональных антител (мАт). Ряд конъюгатов антител с лекарственными препаратами против транспортера NaPi2b проходят доклинические и клинические испытания за рубежом [3–8], но в России такие препараты пока не представлены. С помощью гибридной технологии ранее нами был получен ряд гибридом-продуктов мышинных мАт, которые распознают транспортер NaPi2b. На их основе могут быть в будущем разработаны таргетные препараты для диагностики и/или лечения онкологических заболеваний. Поскольку мышинные мАт обладают высокой иммуногенностью, для разработки на их основе лекарственных препаратов необходимо получить их гуманизированные варианты, которые могут вводиться пациентам многократно, что может быть необходимо при лечении злокачественных новообразований. В связи с этим целью данной работы является создание рекомбинантных векторов, кодирующих гуманизированные варианты мышинных моноклональных антител против натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b, продуцируемых полученными гибридами.

Материалы и методы. Для гуманизации мышинных мАт был использован вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, в котором закодированы константные домены легкой цепи типа каппа и тяжелой цепи IgG1 человека, а также находятся сайты рестрикции для клонирования кДНК переменных доменов легких (VL) и тяжелых (VH) цепей мышинных мАт. Последовательности кДНК для клонирования получали методом ПЦР с использованием в качестве матрицы рекомбинантных плазмид, кодирующих кДНК VL и VH мышинных мАт, которые были получены ранее. Продукты ПЦР обрабатывали соответствующими рестриктазами с последующим лигированием в вектор. Лигазные смеси использовали для трансформации клеток *E. coli* штамма XL1-Blue (Евроген, Россия) методом теплового шока с последующим отбором рекомбинантных клонов с помощью ПЦР-скрининга. Отобранные рекомбинантные клоны использовали для амплификации и очистки векторов, в которых успешно прошло клонирование кДНК VL и VH целевых мышинных мАт, что дополнительно анализировали с помощью ПЦР и рестрикционного анализа. Оценку концентрации и качества полученных образцов проводили методами спектрофотометрии при длине волны 260 и 280 нм и горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Результаты. В результате проведенной работы были получены образцы рекомбинантных векторов, кодирующих гуманизированные варианты целевых мышинных мАт. Успешное клонирование кДНК VL и VH соответствующих мАт было подтверждено методами ПЦР и рестрикционного анализа. Объем каждого из полученных образцов составил 30 мкл. Концентрация рекомбинантных векторов в полученных образцах составила от 300 до 519 нг/мкл при соотношении значений поглощения при 260 и 280 нм от 1,8 до 1,9, что соответствует их высокому качеству.

Заключение. Полученные рекомбинантные векторы могут быть использованы для наработки и очистки гуманизированных мышинных мАт против транспортера NaPi2b в клетках млекопитающих, таких как CHO или HEK293. Дальнейшая характеристика и модификация гуманизированных антител против транспортера

NaPi2b позволит разработать новые эффективные таргетные препараты для диагностики и/или лечения онкологических заболеваний, включая рак яичника.

Ключевые слова: транспортер NaPi2b, антитела, рекомбинантный вектор.

Работа выполнена при инфраструктурной поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

1. Levi M., Gratton E., Forster I.C., Hernando N., Wagner C.A., Biber J., Sorribas V., Murer H. Mechanisms of phosphate transport // Nat Rev Nephrol – 2019. – V. 15 (8). – P. 482 – 500.
2. Gryshkova V., Goncharuk I., Gurtovyy V., Khozhayenko Y., Nespryadko S., Vorobjova L., Usenko V., Gout I., Filonenko V., Kiyamova R. V. The study of phosphate transporter NAPI2B expression in different histological types of epithelial ovarian cancer // Exp. Oncol. – 2009. – V. 31. (1). – P. 37–42.
3. Attinger-Toller I., Probst P., Kallenberger L., Renard E., Bertrand R., Fay R., Santimaria R., Maurhofer P., Grabulovski, D., Schlereth B., Spycher P. R. LB124 / 12 - Targeting NaPi2b with a novel dual TOP1i ADC that shows excellent biophysical properties and high efficacy in vivo / American Association for Cancer Research. April 9, 2024. URL: <https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/20272/presentation/10590>.
4. Berkel P., Horsley E., Jabeen A., Veillard N., Havenith K., Janghra N., Alves P., Oblotte C., Kirby I., Hogg P. W., Zammarchi F., de Haan L. Preclinical development of NaPi2b-PL2202, a novel camptothecin-based antibody-drug conjugate targeting solid tumors expressing NaPi2b / American Association for Cancer Research. April 9, 2024. URL: <https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/20272/presentation/1531>.
5. Helma-Smets J., Schmitt S., Mai I., Machui P., Herterich S., Hauswald D., Ochtrup P., Cyprys P., Kozłowska I., et al. TUB-040, a novel Napi2b-targeting ADC built with ethynylphosphonamidate conjugation chemistry, demonstrates high and long-lasting anti-tumor efficacy via Topoisomerase-I inhibition and excellent tolerability predictive of a wide therapeutic window in humans / American Association for Cancer Research. April 9, 2024. URL: <https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/20272/presentation/6174>.
6. Li R., Huang W., Liu Z., Li Y., Pan H., Qin X., Fei D. Pre-clinical evaluation of a novel antibody drug conjugate (ADC) LM-317 targeting NaPi2b / American Association for Cancer Research. April 9, 2024. URL: <https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/20272/presentation/1127>.
7. Petersen M.E., Brant M.G., Lasalle M., Das S., Duan R., Wong J., Ding T., Wu K.J., Sidapa D., Fang C., Zhang W., et al. Design and Evaluation of ZD06519, a Novel Camptothecin Payload for Antibody Drug Conjugates // Mol Cancer Ther. – 2024. – V. 23. (5). – P. 606 – 618.
8. Xiao L., Lian W., Liu Q., Zong Q., Song S., Stann S., Cai J., Xue T. Preclinical development of YL205, a novel NaPi2b-targeting antibody-drug conjugate (ADC) with novel topoisomerase I inhibitor-based linker-payload for treatment of solid tumors / American Association for Cancer Research. April 8, 2024. URL: <https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/20272/presentation/1127>.

Секция 2

«Молекулярные механизмы программируемой клеточной гибели»

УДК 576.3

Программируемая клеточная гибель: значение процесса для биомедицины

З.И. Абрамова

E-mail: ziabramova@mail.ru

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008, Россия

Введение. Аутоиммунный тиреоидит (АИТ) – хроническое заболевание щитовидной железы, основную роль в патогенезе которого играют чрезмерно стимулированные CD4⁺ Т-лимфоциты, которые провоцируют активацию CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов, что приводит к Fas-зависимому апоптозу тиреоцитов и снижению гормональной активности щитовидной железы [1, 2]. По данным исследований важным процессом, принимающим участие в патогенезе аутоиммунных заболеваний, является аутофагия. Аутофагия – клеточный процесс, в норме поддерживающий клеточный гомеостаз путем деградации поврежденных белков и органелл в аутолизосомах. По данным литературы исследования в области АИТ преимущественно нацелены на модулирование иммунного ответа для уменьшения степени повреждения щитовидной железы [3, 4]. Следовательно, большой потенциал заключается в расширении набора фармакологических вмешательств, направленных на аутофагию, чтобы сбалансировать ее цитопротекторные эффекты против последствий нарушения самого процесса. В связи с этим целью проведенного исследования стал анализ процесса аутофагии в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов с АИТ и экспрессии его ключевых белков-регуляторов.

Материалы и методы. Для оценки развития процесса по изменению количества аутофагосом в клетках использовали метод проточной цитофлуориметрии. Уровень экспрессии белков-маркеров определяли методом вестерн-блоттинга.

Результаты. Мы установили, что мононуклеарные клетки, выделенные от пациентов с АИТ, показывают значительное накопление аутофагосом по сравнению с клетками здоровых доноров, как на базальном уровне, так и после 72-часового культивирования с низким содержанием сыворотки. Мы предполагаем, что эти данные указывают на нарушения аутофагического процесса в лимфоцитах при АИТ. Накопление аутофагосом, свидетельствующее об усилении активации процесса аутофагии, говорит о попытке клеток справиться со стрессом, что особенно заметно в клетках больных АИТ в условиях пониженного содержания сыворотки. Дальнейший анализ процесса аутофагии дополнил наши наблюдения: оценка белков-маркеров (Vps34, p62 и LC3) выявила значительные изменения их количества в лимфоцитах пациентов с АИТ. Белок Vps34 имеет критическое значение для формирования аутофагосом. Повышенная экспрессия Vps34 предполагает повышенную аутофагическую

активность у пациентов с АИТ, что соответствует усилению инициации аутофагии. Высокие уровни p62 в лимфоцитах при АИТ на фоне высокого уровня липидированного белка LC3-II, особенно после 72-часового культивирования, предполагают нарушение аутофагического процесса (в частности слияния аутофагосом с лизосомами) и как следствие замедление процессов деградации аутофагосом. При невозможности полноценного протекания всех стадий аутофагии активация данного процесса приводит лишь к чрезмерному накоплению аутофагосом в цитоплазме лимфоцитов, что, в свою очередь, способствует активации апоптоза и последующей гибели клетки.

Заключение. В будущих исследованиях предстоит выяснить, в какой субпопуляции лимфоцитов происходит нарушение аутофагии – в клетках-хелперах с маркером CD4⁺, цитотоксических CD8⁺-Т-лимфоцитах или В-лимфоцитах, участвующих в разрушении тироцитов при АИТ. «Правильная» аутофагия в этих клетках имеет решающее значение для поддержания иммунной толерантности и предотвращения чрезмерных иммунных реакций. Другим примером является популяция CD4⁺CD25⁺ Т-клеток человека, которая гетерогенна по функциональным свойствам и фенотипическим признакам. Она включает в себя популяции пролиферирующих CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺CD25^{low} Т-клеток и «регуляторных» (Treg–Tregulatory) CD4⁺CD45RO⁺CD25^{high} Т-лимфоцитов. Являясь реальными супрессорами, они играют ведущую роль во многих иммунологических процессах. Так, они регулируют Т-клеточный гомеостаз, предотвращают аутоиммунные заболевания, аллергии, гиперчувствительность. Аутофагия Treg необходима для контроля чрезмерных иммунных реакций и предотвращения аутоиммунитета. Понимание того, как нарушение аутофагии в этих подтипах лимфоцитов может влиять на прогрессирование аутоиммунного тиреоидита, представляет большой интерес. Восстановление нормальных механизмов клеточного клиренса, может оказаться многообещающим методическим подходом в решении проблемы повреждений, связанных с возникновением и развитием аутоиммунного тиреоидита.

Ключевые слова: лимфоциты, аутофагия, аутоиммунный тиреоидит.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (No 23-25-00443)

1. Трошина Е.А. Хронический аутоиммунный тиреоидит — «сигнальное заболевание» в составе мультиорганного аутоиммунного синдрома // Проблемы эндокринологии. – 2023. – Т. 69(4). – С. 4–10.
2. Лукьянчиков В.С. Аутоиммунный тиреоидит. Связь с тиреоидными и неэндокринными метаплазиями // РМЖ. – 2013. – Т. 21(12). – С. 657–659.
3. Pyzik A., Grywalska E., Matyjaszek-Matuszek B., Roliński J. Immune disorders in Hashimoto's thyroiditis: what do we know so far? // Journal of immunology research. – 2015. – Article ID 979167, 8 p.
4. Salmaso C. Regulation of apoptosis in endocrine autoimmunity: insights from Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2002. – V. 996(1). – P. 496–501.

Хлорид лития индуцирует аутофагию в тканях печени**Д.С.Вологин^{1,2}, А.А.Пономарева¹, С.А.Дмитриева¹**

E-mail: dimsovsky@gmail.com

¹Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, 420111, Россия²Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, 420059, Россия

Введение. В настоящее время активация аутофагии считается одной из перспективных стратегий лечения и профилактики разнообразных неинфекционных заболеваний печени. Известно, что ионы лития могут индуцировать аутофагию во множестве клеточных систем и в различных органах [1]. Кроме того, Li^+ рассматривают как мощный антиоксидант, обладающий адаптогенным и противовоспалительным действием, участвующим в регуляции работы сердечно-сосудистой, эндокринной, репродуктивной, выделительной, иммунной и нервной систем, а также положительно регулирующий различные клеточные процессы, включая клеточный цикл, программируемую клеточную смерть (ПКС) и канцерогенез. Однако Li^+ может оказывать не только антиоксидантное и защитное действие на митохондрии, но и ингибировать I комплекс ЭТЦ [2], что в свою очередь приведет к развитию окислительного стресса и нарушению энергетического метаболизма. Широкий спектр биологического действия Li^+ , в том числе при модуляции аутофагии, обусловлен в основном ингибированием двух ключевых метаболических ферментов – гликогенсинтазы киназы-3 и инозитолмонофосфатазы, которые вовлечены в регуляцию различных клеточных функций [3]. Для тканей печени роль Li^+ в активации аутофагии противоречива и исследуется преимущественно в условиях *in vitro* на модельных системах. Печень, в данном контексте, является уникальным органом, который содержит большое количество митохондрий, обладает одной из самых мощных систем антиоксидантной защиты и высоким конститутивным уровнем аутофагии. Таким образом, влияние Li^+ на редокс-процессы и модуляцию аутофагии в печени в условиях *in vivo* требует детальной расшифровки механизмов его действия, как при краткосрочном, так и при длительном воздействии. Целью настоящего исследования была оценка накопления аутофагосом и изменения редокс-метаболизма в тканях печени в условиях *in vivo* при действии индуктора аутофагии – хлорида лития.

Материалы и методы. Исследование было проведено на печени трехмесячных самцов белых лабораторных мышей CD-1 и одобрено комиссией по биоэтике ФИЦ КазНЦ РАН (№ 23-1/23-2/2 от 28 февраля 2023 г). Мыши получали LiCl перорально вместе с питьевой водой в концентрациях 5, 10 и 15 мг/кг/сут в течение 3 сут. Уровень окислительного стресса оценивался по уровню перекисного окисления липидов (ПОЛ), активность ферментов антиоксидантной защиты – по активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы,

глутатионредуктазы, как описано ранее [4]. Анализ ультраструктурных изменений в тканях проводили по стандартной методике.

Результаты. При анализе ультраструктуры клеток было выявлено, что характерной особенностью для всех исследованных концентраций LiCl было накопление в цитоплазме гепатоцитов, значительного количества аутофагосом на разных этапах формирования, что, несомненно, свидетельствует об активации процесса. При этом аутофагосомы часто содержали мембранные компоненты клетки, такие как митохондрии и эндоплазматический ретикулум (ЭР). Однако митохондрии, находящиеся в цитоплазме гепатоцитов, после 3-суточного воздействия LiCl характеризовались лишь небольшими изменениями в морфологии (просветление или конденсация митохондриального матрикса) и трансформацией формы (удлинение), что свидетельствует об адаптационных морфофункциональных перестройках и отсутствии значительного повреждающего действия лития во всех исследованных концентрациях на эти органеллы. Проведенное нами исследование показало, что ни одна из исследованных концентраций LiCl не оказала сильного воздействия на развитие окислительного стресса, уровень ПОЛ достоверно не отличался от уровня в контрольном варианте. Однако воздействие LiCl привело к достоверной активации всех исследованных ферментов антиоксидантной защиты, при этом увеличение активации СОД имело ярко выраженную концентрационную зависимость. Учитывая вышеизложенное, мы предполагаем, что усиление активности ферментов антиоксидантной защиты обусловлено, вероятно, повышенной генерацией супероксидного анион-радикала и активацией редокс-метаболизма при действии LiCl. За счет своевременного удаления окисленных/поврежденных макромолекул и клеточных компонентов литий-индуцируемая аутофагия способствует антиоксидантной защите клеток, поддержанию редокс-метаболизма и сохранению структурно-функциональной целостности клеток. При этом активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в инициации процесса и вовлечены в редокс-регуляцию аутофагии с помощью различных молекулярных сигнальных путей на транскрипционном, посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях [5]. Интересно, что наиболее значительные изменения при действии LiCl затрагивали ЭР: снижалось количество параллельно расположенных цистерн шероховатого ЭР в цитоплазме, происходило набухание и расширение канальцев, а также изменялись зоны контактов ЭР с митохондриями. При действии 15 мг/кг LiCl происходило наибольшее расширение канальцев ЭР, которое свидетельствует о значительных нарушениях в ультратонких взаимодействиях между ЭР и митохондриями, что приводит к структурно-функциональным перестройкам в зоне их контактов [6].

Заключение. Таким образом, пероральное применение LiCl в течение 3 сут активировало процессы аутофагии в тканях печени. Это сопровождалось морфофункциональными изменениями в ультраструктуре основных АФК-генерирующих органелл – митохондрий и ЭР, в том числе наблюдалось усиление их аутофагической деградации. Мы предполагаем, что воздействие LiCl в тканях печени сопровождается усилением генерации АФК, необходимых для запуска процесса аутофагии, в качестве сигнальных молекул. При этом в печени здоровых особей благодаря

усилению процесса аутофагии и адекватной работе систем антиоксидантной защиты, в частности за счет усиления активности ряда антиоксидантных ферментов, развития окислительного стресса не происходит. Однако необходимы детальнейшие экспериментальные исследования эффективности данного индуктора аутофагии при различных патофизиологических состояниях печени, например, при нарушениях липидного метаболизма, поскольку длительная активация аутофагии может выступать не только как адаптивная защитная реакция, но и активировать различные типы ПКС, в том числе аутофагической.

Ключевые слова: аутофагия, печень, хлорид лития, перекисное окисление липидов, ферменты антиоксидантной защиты.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного Фонда и Академии наук Республики Татарстан по проекту № 24-25-20086.

1. Nah J., Zablocki D., Sadoshima J. The role of autophagic cell death in cardiac disease // J. Mol. Cell Cardiol. – 2022. – V. 173. – P. 16 – 24.
2. Cikánková T., Fišar Z., Hroudová J. In vitro effects of antidepressants and mood-stabilizing drugs on cell energy metabolism // Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 2020. – V. 393(5). – P. 797 – 811.
3. Bortolozzi A., Fico G., Berk M., Solmi M., Fornaro M., Quevedo J., Zarate C.A., Kessing L.V., Vieta E., Carvalho A.F. New Advances in the Pharmacology and Toxicology of Lithium: A Neurobiologically Oriented Overview // Pharmacol. Rev. – 2024. – V. 76(3). – P. 323 – 357.
4. Дмитриева С.А., Краснова А.Н., Вологин Д.С., Пономарева А.А. Особенности редокс-метаболизма и ультраструктура гепатоцитов печени мыши при изменении режима кормления // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. – Пущино. – 2023. – С.469 – 474.
5. Li L., Tan J., Miao Y., Lei P., Zhang Q. ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms // Cell Mol. Neurobiol. – 2015. – V. 35(5). – P. 615 – 621.
6. Vance J.E. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – V. 1841(4). – P. 595 – 609.

УДК: 575.2.084

Применение генно-модифицированных стволовых клеток, экспрессирующих индуцирующий апоптоз лиганд TRAIL в противоопухолевой терапии на моделях глиобластомы человека *in vitro*

М.Г. Саидгараева¹, А.В. Городилова¹, И. И. Абдрахманова^{1,2}, И. Ю. Филин¹, В. М. Чернов^{1,2}, А. А. Ризванов¹, В. В. Соловьева¹

E-mail: milanasaidgaraeva@gmail.com

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

²ФИЦ Казанский научный центр РАН, г. Казань, Россия

Введение. Заболеваемость первичными злокачественными новообразованиями центральной нервной системы (ЗНО ЦНС) является актуальной проблемой, в Российской Федерации в 2019 г показатель заболеваемости составил 5,0 и 3,8 случая на 100 тыс. мужского и женского населения соответственно [1]. Наибо-

лее распространенной формой ЗНО ЦНС является глиобластома, зачастую приводящая к летальному исходу. Так, по данным национального ракового регистра РФ ИАС «Канцер-регистр» смертность от опухолей ЦНС в Приволжском федеральном округе за 2020 год составило 4,97 случая на 100 тыс. населения. Перспективным методом адъювантной терапии онкологических заболеваний является индукция апоптоза опухолевых клеток, опосредованная действием биомаркера TRAIL на проапоптотические рецепторы DR4 и DR5. Белок TRAIL, относящийся к суперсемейству TNF, взаимодействует с функциональными рецепторами смерти, что позволяет им оказывать действие на широкий спектр клеточных линий, в том числе на клетки глиобластомы. Большую популярность приобрели методы терапевтического применения производных стволовых клеток жировой ткани (hADSC). Исходя из имеющихся данных целью исследования является изучение противоопухолевого действия генетически-модифицированных жировых МСК в отношении клеток глиобластомы человека *in vitro*.

Материалы и методы. Первичная культура ADSC была выделена из жировой ткани пациента в соответствии с утвержденными этическими стандартами и действующим законодательством (протокол одобрен Локальным этическим комитетом КФУ, протокол № 3 от 23.03.2017). Для оценки мультипотентности выделенной клеточной линии производилась дифференцировка в адипоциты, остеобласты и хондробласты. Стволовые клетки жировой ткани были модифицированы лентивирусным вектором, кодирующим последовательность TRAIL (LV-TRAIL), для оценки эффективности трансдукции клетки параллельно были модифицированы лентивирусным вектором, кодирующим дальне-красный флуоресцентный белок *katushka2S* (LV-*katushka*). Экспрессия белка *katushka* была подтверждена с помощью флуоресцентной микроскопии. Сверхэкспрессия TRAIL в генетически модифицированных клетках была подтверждена методом вестерн-блот анализа. Для оценки противоопухолевого эффекта использовали кондиционированную среду МСК. Клеточные линии U-138 культивировались на контрольной среде, взятой из нативных hADSC, среде из трансдуцированных hADSC-TRAIL и hADSC-*katushka*. Оценка жизнеспособности опухолевых клеток каждого из образцов производилась посредством МТТ-теста.

Результаты. Выделенные из жировой ткани клетки оказались способны к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлении, что доказывает их принадлежность к стволовым клеткам жировой ткани. Детекция красного флуоресцирующего белка *katushka* и результаты вестерн-блотта послужили доказательством успешной трансдукции hADSC лентивирусным вектором. С помощью МТТ-теста было доказано, что жизнеспособность клеточной линии U-138, в подтверждение предположения, снизилась. Жизнеспособность в среде нативных hADSC составила 98%, культивируемых в кондиционированной среде hADSC-TRAIL снизилась до 88%.

Заключение. Резюмируя полученные данные, можно сделать вывод, что применение производных генно-модифицированных стволовых клеток жировой ткани, а именно hADSC-TRAIL является перспективным адъювантным методом борьбы с моделью глиобластомы человека *in vitro*. Дальнейшее изучение этого

метода позволит увеличить эффективность терапевтического эффекта и установить новые механизмы борьбы с глиобластомой человека.

Ключевые слова: противоопухолевая терапия, индукция апоптоза, глиобластома человека.

УДК: 616.441+008.63

Влияние окислительного стресса на активность киназы mTO в CD4⁺T-лимфоцитах при аутоиммунном тиреоидите

А.Н. Тихонова, А.В. Бурцева, З.И. Афанасьева, З.И. Абрамова

E-mail: askatix@mail.ru

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Аутоиммунные заболевания щитовидной железы (ЩЖ) и их связь с окислительным стрессом (ОС) становятся важной социальной проблемой. Исследования показывают, что у пациентов с АИТ баланс между окислителями и антиоксидантами смещен в сторону окислительной активности, что делает ОС важным фактором патофизиологии заболевания [1], в частности было показано [4] активные формы кислорода (АФК) играют ключевую роль в ОС, приводя клетки к повреждению и апоптозу. В патогенезе АИТ основное внимание уделяется клеточному иммунитету. Генетически обусловленные CD4⁺ Т-лимфоциты ошибочно атакуют клетки ЩЖ. H₂O₂ может индуцировать апоптоз, позволяя организму удалять клетки с ослабленным антиоксидантным потенциалом. В настоящее время исследования акцентируют внимание на эндогенных механизмах антиоксидантной защиты, включая аутофагию, как важные для иммунного ответа на повреждение клеток. Аутофагия играет ключевую роль в негативной селекции аутореактивных Т-клеток. Исследования [2] подтверждают, что дефицит аутофагии в периферических Т-клетках вызывает ускоренную клеточную смерть наивных Т-клеток, что связано с продукцией супероксидных анионов. Аутофагия это процесс, который включает захват субстратов в аутофагосомы и их переработку в аутофаголизосомах, что способствует клеточной адаптации и снижению окислительного повреждения. Важной функцией аутофагии является изоляция поврежденных митохондрий, что предотвращает апоптоз. Удаление поврежденных митохондрий с помощью аутофагии называется митофагией что исключительно также важно для защиты клеток от окислительного стресса и нарушений метаболизма [3].

Цель данного исследования – анализ влияния окислительного стресса на аутофагию CD4⁺ Т-лимфоцитов у больных аутоиммунным тиреоидитом.

Методы и материалы. В качестве объекта исследования использовали CD4⁺ Т-лимфоциты периферической крови здоровых доноров и пациентов с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ). Выделение лимфоцитов проводили на градиенте плотности раствора фиколл-урогафина ($\rho=1,077$), для выделения популяции CD4⁺ Т-лимфоцитов использовали метод иммуно-магнитной сепарации. Для определения влияния окислительного стресса, выделенные CD4⁺Т-лимфоциты инкубировали в течение 24 ч в растворе H₂O₂ в концентрации от 0 до 40 мкМ в

RPMI-1640. Уровни АФК, аутофагии и апоптоза CD4⁺T-лимфоцитов оценивали на проточном цитометре BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Для анализа белков-маркеров аутофагии - p62, LC3I/II, киназы mTOR и регулятора апоптоза Bcl-2 в CD4⁺T-лимфоцитах пациентов и здоровых доноров использовали Вестерн-блоттинг. Для оценки аутофагического клиренса митохондрий CD4⁺T-лимфоциты анализировали на конфокальном микроскопе ZEISS LSM 980. Достоверность полученных результатов определяли с помощью анализа ANOVA.

Результаты. Инкубация CD4⁺ T-лимфоцитов здоровых доноров с H₂O₂ (10–40 мкМ) приводила к увеличению уровня АФК-положительных клеток по сравнению с интактными клетками. В группе с АИТ относительное количество АФК-положительных клеток было ниже ($p < 0,05$), и это отличие усиливалось с увеличением концентрации H₂O₂. Уровень апоптоза (аннексин V положительные клетки) в свежевыделенных лимфоцитах здоровых доноров был выше, чем у пациентов с АИТ. Это различие увеличивалось при культивировании клеток с экзогенной H₂O₂. Мы установили, что средняя апоптотическая активность в клетках пациентов с АИТ ниже контроля, примерно, в 1,2 раза.

В свежевыделенных CD4⁺T-клетках пациентов с АИТ содержание аутофагосом было выше по сравнению с контролем. При увеличении H₂O₂ аутофагическая активность снижалась как у здоровых доноров, так и у пациентов с АИТ, однако количество аутофагосом оставалось высоким у пациентов с АИТ. Это свидетельствует о снижении чувствительности к апоптозу и активации аутофагии, которая сопровождается увеличением количества аутофагосом в клетках. При увеличении концентрации H₂O₂ на фоне низкого уровня mTOR в CD4⁺T-лимфоцитах пациентов с АИТ экспрессируются цитоплазматический белок LC3-I, его липидированная форма LC3-II. Уровень p62 также возрастает.

Баланс между аутофагией и апоптозом поддерживается системой взаимодействий между сигнальными путями, в которых задействованы как ключевые белки аутофагии, так и апоптоза. Одним из общих регуляторов этого взаимодействия является антиапоптотический белок Bcl-2. Этот белок относится к белкам – ингибиторам посткаспазного каскада, которые регулируют митохондриальный путь апоптоза. Каноническая функция Bcl-2 связана с его способностью ингибировать проницаемость митохондриальной мембраны, помимо поддержания митохондриальной целостности, Bcl-2 связан с клеточным окислительно-восстановительным состоянием, кроме того, функция ингибирования апоптоза белком Bcl-2 тесно связана с сигнальным путем ПКГ II типа, т.е. аутофагией. Маркеры аутофагии также показали отклонение в функционировании от нормы: отмечено повышенное количество белка Bcl-2 у пациентов с АИТ и накапливается количество p62 белка. Эти биохимические показатели свидетельствовали о возможном повреждении митохондрий при АИТ.

Ключевые белки макроаутофагии LC3 (биомаркер формирования активных аутофагосом) и адаптерный белок p62 (регулятор аутофагии, участвующий в формировании аутофагосом) также находятся в тесном взаимодействии с митохондриальными белками и участвуют в индукции конститутивной митофагии. Функциональное связывание липидированной формы белка LC3-II и p62 важно для

нормального протекания этого процесса. На экспериментальной модели в условиях возрастания перекиси H_2O_2 мы показали, что АФК активируют цитоплазматический LC3-I в клетках пациентов с АИТ, и накапливается аутофагический белок-адаптер p62, который регистрируется на внешней митохондриальной мембране, что свидетельствует об участии митофагии в патогенезе заболеваний. И установленный в эксперименте повышенный уровень митофагосом в CD4+T клетках пациентов с АИТ, подтверждает наше предположение о нарушении функций митохондрий при АИТ, делая CD4+T клетки цитотоксическими.

Заключение. Накопление таких клеток в ткани ЩЖ может приводить к нарушению апоптоза в тироцитах и как следствие ко вторичному некрозу. Результат - развитие аутоиммунного ответа. Полученные данные требуют дополнительных исследований, т.к. выявление в крови пациентов с АИТ CD4+T - лимфоцитов, склонных к апоптозу или к некрозу, может использоваться как диагностический критерий прогноза воспалительного процесса.

Ключевые слова: окислительный стресс, апоптоз, аутофагия, CD4+T-лимфоциты, аутоиммунный тиреоидит.

1. Ates I., Arıkan, M. F., Altay, M., Yılmaz, F. M., Yılmaz, N., Berker, D., Guler, S. The effect of oxidative stress on the progression of Hashimoto's thyroiditis // Archives of physiology and biochemistry. – 2018. – V. 124. – №. 4. – P. 351 – 356.
2. Pua H. H., Guo J., Komatsu M., He Y. W. Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes // The Journal of Immunology. – 2009. – T. 182. – №. 7. – P. 4046 – 4055.
3. Буданов А.В. Роль сестринов в регуляции клеточного ответа на стресс // Успехи современной биологии. – 2022. – Т. 142, № 1 – С. 5 – 24.
4. Рыбакова А. А., Платонова Н. М., Трошина Е. А. Оксидативный стресс и его роль в развитии аутоиммунных заболеваний щитовидной железы // Проблемы эндокринологии. – 2019. – Т. 65. – №. 6. – С. 451– 457.

Секция 3
«Молекулярные основы медицинской биохимии»

УДК: 612.816.7

**Модуляторные свойства оксида азота в функционировании
Na⁺/Ca²⁺-обменника в нервно-мышечном синапсе мышцы**

С. Нгомси¹, Г.Ф. Закирьянова^{2,3}, А.М. Петров^{2,4}

e-mail: danicastats@yahoo.fr

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

²Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН,
г. Казань, 420111, Россия

³Московский государственный университет, г. Москва, 119234, Россия;

⁴Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, 420012

Введение. Na⁺/Ca²⁺-обменник является интегральным белком и играет важную роль в поддержании гомеостаза кальция в клетке [1], но мало что известно о его функциональной роли в нервно-мышечном синапсе. Известно, что данный транспортер может присутствовать в плазматической мембране во всех тканях с преобладанием специфичных изоформ, а также в мембране внутренних органелл, например, в митохондриях, где он может способствовать снижению перезагрузки кальцием кардиомиоцитов и нейронов [2]. Или же в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) микроглии, где Na⁺/Ca²⁺-обменник приходит в активное состояние под действием оксидом азота (NO) [3]. На самом деле, Na⁺/Ca²⁺-обменник может активироваться протеинкиназами [4], которые, в свою очередь, могут активироваться NO (например, протеинкиназа G) [5]. Следовательно, можно предположить, что NO может играть одну из ключевых ролей в модуляции работы Na⁺/Ca²⁺-обменника. Исходя из вышесказанного, была поставлена цель: исследовать роль оксида азота в функционировании Na⁺/Ca²⁺-обменника в нервно-мышечном синапсе мышцы.

Материалы и методы. Эксперименты проводились на диафрагмальной мышце мыши (возраст 3-5 месяцев, n≈10). Применялся метод флуоресцентной микроскопии с использованием красителя на кальций Fluo-8 AM (2 мкМ). Для блокирования Na⁺/Ca²⁺-обменника использовался специфичный блокатор ORM-10103 (1 мкМ). Для увеличения уровня внутриклеточного кальция применялся кофеин (10 мМ), который способствует выбросу кальция из ЭПР через рианодиновые рецепторы. В качестве инструмента для снижения уровня NO применялся L-NAME (100 мкМ) (N-нитро-L-аргинин метиловый эфир), который подавляет его синтез путем ингибирования NO-синтазы. Для увеличения проницаемости мембраны для красителей параллельно с окрашиванием в раствор с препаратом добавляли Pluronic F-127. Для колоколизации в синаптическом регионе использовался меченый α-бунгаротоксин, который связывается с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами.

Результаты. Экспериментальные данные показали, что в покое флуоресценция красителя на кальций Fluo-8 практически не меняется в синаптическом регионе, однако при добавлении блокатора Na⁺/Ca²⁺-обменника ORM-10103 происходит не-

большое увеличение уровня кальция. При добавлении кофеина наблюдается большое увеличение флуоресценции Fluo-8, но на фоне блокатора ORM-10103 происходит усиление эффекта кофеина на интенсивность свечения кальциевого индикатора. Эти серии экспериментов подтверждают то, что обменник является важным транспортером, который удаляет избыточный кальций из клетки. Как упоминалось выше, NO опосредованно может модулировать активность $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника [5]. При снижении синтеза NO с использованием L-NAME наблюдалось увеличение флуоресценции красителя Fluo-8, что может предполагать наличие NO-зависимой активации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника. При ингибировании NO-синтазы кофеин вызывал меньший прирост флуоресценции Ca^{2+} индикатора. Однако, если в этих условиях дополнительно был заблокирован $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник, то прирост Ca^{2+} , вызванного кофеином, восстанавливался. Следовательно, в данном случае, вероятно, сам оксид азота может усиливать активность рианодиновых рецепторов.

Заключение. Полученные результаты говорят о том, что $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник является важным белком, который участвует в удалении внутриклеточного кальция из клетки как в состоянии покоя, так и при его избытке, который, как в данном случае, был вызван выходом кальция из внутриклеточных депо под воздействием кофеина. Опираясь на литературные данные об участии NO в активации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника в других тканях, в данной работе было показано, что NO действительно способен активировать обменник в нормальных условиях. Требуются дальнейшие исследования для раскрытия молекулярных путей, опосредующие данный эффект.

Ключевые слова: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -транспортер, нервно-мышечный синапс, оксид азота, флуоресцентная микроскопия.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-75-10022.

1. Garbincius J.F., Salik O., Cohen H.M., Choya-Foces C., Mangold A.S., Makhoul A.D., Schmidt A.E., Khalil D.Y., Doolittle J.J., Wilkinson A.S., Murray E.K., Lazaropoulos M.P., Hildebrand A.N., Tomar D., Elrod J.W. TMEM65 regulates NCLX-dependent mitochondrial calcium efflux // bioRxiv. – 2023. – № 2023.10.06.561062.
2. Matsuda T., Nagano T., Takemura M., Baba A. Topics on the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger: responses of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger to interferon-gamma and nitric oxide in cultured microglia. // J Pharmacol Sci. – 2006. – V. 102. – P. 22 – 26.
3. Matsuoka S. Forefront of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger studies: regulation kinetics of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers // Journal of Pharmacological Sciences. – 2004. – V. 96. – P. 12 – 14.
4. Yamanaka J., Nishimura J., Hirano K., Kanaide H. An important role for the $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchanger in the decrease in cytosolic Ca^{2+} concentration induced by isoprenaline in the porcine coronary artery // Journal of Physiology. – 2003. – V. 549. – P. 553 – 562.
5. Mombouli J. V., Vanhoutte P. M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy // Journal of Molecular and Cellular Cardiology. – 1999. – V. 31. – P. 161 – 174.

Evaluation of the antimicrobial efficacy and toxicity of *Ageratum conyzoides* L. used in the traditional treatment of vaginal infections in southern-Benin

Cyrille A. VODOUNON¹, Gabin A. DOSSOU¹, Haziz A. O. SINA²

e-mail: sweetiebj@yahoo.fr

¹Laboratory of Natural Sciences and applications. ENS-Natitingou, National University of Sciences, Technologies, Engineering and Mathematics. 01BP526 Goho Abomey, Republic of Benin

²Laboratory of Biology and Molecular Typing in Microbiology, University of Abomey-Calavi, Cotonou 05 BP 1604, Republic of Benin

Background. Vaginal infections are highly endemic with serious health consequences for women in Africa. The modern treatment of these infections is not always effective and sends the population back to the use of medicinal plants.

Ageratum conyzoides L. is a small annual herbaceous plant and highly odorous, and invasive of the *Asteraceae* family with widespread use in traditional medicine. This study aims to evaluate the *in vitro* toxicity and antimicrobial activity of extracts of the aerial part of *A. conyzoides* on strains responsible for vaginal infections.

Material and Methods. An ethnobotanical survey has been carried out on *A. conyzoides* among ethnobotanists and traditional therapists in fifteen markets in Abomey-Calavi, Cotonou, Zogbodomey, Bohicon and Abomey. Antimicrobial activity was evaluated on reference and clinical strains of *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Escherichia coli* by the microdilution method in wells from aqueous and ethanolic extracts of the leafy stem of *A. conyzoides*. The toxicity test was conducted by assessing the sensitivity of *Artemia salina* larvae to the different extracts.

Results. The survey showed that the population of South Benin uses *A. conyzoides* according to different modes of preparation (decoction 42.55%, trituration 16.99%, maceration 14.38%, infusion 9.8% or carbonization 0.65%) in the treatment of a variety of pathologies affects the female reproductive system. The Minimum Inhibitory Concentration varied from 2.5 to 5 mg/ml for the different extracts tested. Both extracts showed a bactericidal and fungicidal effect on the different strains studied but the sensitivity of the strains to the aqueous extract is better considered compared to the ethanolic extract (62.5% for ethanolic extract unlike 75% for aqueous extract). No toxicity is revealed for both extracts. In effect, the R^2 correlation coefficient is less than 0.8. Referring to the toxicity scale, Mousseux (1995), extracts with an LC50 greater than are considered non-toxic.

Conclusion. The results obtained showed that the aqueous and ethanolic extracts of the aerial part of *A. conyzoides* have antimicrobial properties on strains responsible for vaginal infections and do not present a toxicity.

Keywords: antimicrobial efficacy, vaginal infections, ethnobotanist, ethanolic extracts.

Skin disorders due to Panton-Valentine leucocidin-producing *Staphylococcus aureus*: profile and immunological follow-up of patients in peri-urban Benin

Cyrille A. VODOUNON¹, Hachim R.B I. MAMADOU¹, Gabin A. DOSSOU¹, Haziz SINA², Lamine BABA-MOUSSA²

e-mail: sweetiebj@yahoo.fr

¹Laboratory of Natural Sciences and applications. ENS-Natitingou, National University of Sciences, Technologies, Engineering and Mathematics. O1BP526 Goho Abomey, Republic of Benin

²Laboratory of Biology and Molecular Typing in Microbiology, University of Abomey-Calavi, Cotonou 05 BP 1604, Republic of Benin

Background. *Staphylococcus aureus* is a ubiquitous pathogen, causing a broad spectrum of diseases. About 3% of *S. aureus* strains express a virulence factor called Panton and Valentine Leucocidin (PVL). The pathogenic power of *Staphylococcus aureus* is due to its ability to easily adapt to human immunity through the production of various virulence factors that can strategically counteract different stages of the innate immune response. Thus, it delays the adaptive immune response and promotes bacterial spread to deep tissues and organs. The virulence factors of *Staphylococcus aureus* primarily target leukocytes, as seen in a group of bipartite leukotoxins called 'pore-forming toxins' [1, 2]. This study aims to highlight the role of Panton and Valentine's Leucocidin in staphylococcal skin diseases in the peri-urban area of Benin.

Material and Methods. The study involved a cohort of 124 patients with staphylococcal diseases received at the "Réservoir de Siloé" health center in Hlagba-ouassa, commune of Zogbodomey, in southern Benin. Data were collected retrospectively in 71 patients and prospectively and longitudinally in 53 patients. The patients were profiled on the basis of sociodemographic, microbiological, and immunological parameters. CRP, SV, NB and CD4 were evaluated in the patients.

Results: The patients were predominantly female with a sex ratio of 0.8. The microbiological analysis showed that 29.61% of *S. aureus* strains were resistant to the antibiotics tested. But the *S. aureus* strains are 100% sensitive to Vancomycin and Ciprofloxacin. *S. aureus* strains produce LPV in 73.98% of cases and are 89.15% sensitive to methicillin. The follow-up showed that patients with LPV+ presented at the beginning of the treatment, a hyperleukocytosis (91.18%) and a decrease of CD4 compared to those with LPV.

Conclusion: LPV-producing *S. aureus* occupies an important place in staphylococcal infections. The presence of methicillin-sensitive strains suggests the loss of the methicillin resistance gene by horizontal transfer.

Keywords: skin diseases, *Staphylococcus aureus*, leukocytes, antibiotics.

1. Leistner R., Hanitsch L.G., Krüger R., Lindner A.K., Stegemann M.S., Nurjadi D. Skin infections due to Panton-Valentine leukocidin-producing *S. aureus*.//Dtsch Arztebl Int. – 2022. – V. 119. – P. 775–784.

2. Bethe A, Schink A, Brombach J, Epping L, Semmler T, Reinhardt S, et al. Pantone-Valentine Leukocidin-Positive Staphylococcus aureus in Family and Pet Cat. // Emerg Infect Dis. – 2024. – V. 30 (8). – P. 1724 – 1726. <https://doi.org/10.3201/eid3008>

УДК: 615.072

Спектрофотометрический метод анализа флуоксетина

А.А. Ахметова, А.Н. Фаттахова

E-mail: alsuakhmetova1@yandex.ru

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Заметный рост депрессивных расстройств в последнее десятилетие, обусловленный психогенными факторами и проявляющийся в различных нарушениях соматической и вегетативной сфер, приводит к широкому применению психотропных препаратов, в том числе флуоксетина. Флуоксетин, считающийся наиболее эффективным антидепрессантом в борьбе с депрессивными состояниями, повышает концентрацию нейромедиаторов в синаптической щели для восстановления баланса моноаминовых систем организма. Для определения его концентрации в различных средах используется спектрофотометрический метод, который позволяет получить УФ-спектр образца, тождественный спектру флуоксетина. На основании всех этих данных была поставлена цель: использовать спектрофотометрический метод количественного определения флуоксетина с использованием оптического образца сравнения калия дихромата.

Материалы и методы. Для определения концентрации флуоксетина был использован спектрофотометрический метод, основанный на сравнении спектра исследуемого образца со спектром калия дихромата. Флуоксетин обладает двумя полосами поглощения с максимумами поглощения в УФ-области при длинах волн 224 ± 1 нм, 262 ± 1 нм (рН 1,3; 7,1) и при длинах волн 228 ± 1 нм, 262 ± 1 нм (рН 6,2; 13,2) [1]. Следует отметить, что при переходе от рН = 1,3 к рН = 13,2 наблюдается гиперхромный эффект [2]. Спектрофотометрический анализ флуоксетина проводится на длинноволновом максимуме поглощения (262 нм) в водном растворе, что обеспечивает более точное определение его концентрации. Абсолютные спектры растворов флуоксетина и дихромата калия получали против бидистиллированной воды на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 в области от 200 до 240 нм с шагом 10 нм в кварцевых кюветах с толщиной рабочего слоя 1 см.

Результаты. Анализ абсолютных спектров на калибровочном графике позволили выявить одинаковые значения оптической плотности для нескольких длин волн и использовать данную гомологию для получения коэффициента пересчета (Табл. 1).

Таблица 1.

Значения коэффициентов пересчета на основании анализа спектров флуоксетина и дихромата калия

Концентрация раствора дихромата калия, М	№ пика	Длина волны	Оптическая плотность, ед. опт.пл.	Оптическая плотность раствора флуоксетина	Коэффициент пересчета
0,001	1	204,7	1,030	0,304	3,388
	2	207,0	1,830	0,503	3,638
0,01	1	218,3	1,900	1,652	1,150
	2	228,5	2,220	2,003	1,108
0,1	1	230	1,220	2,005	0,608
	2	237	1,250	2,100	0,595

Расчет коэффициента пересчета проводили по данной формуле:

$K_{\text{п}} = \frac{D_{\text{калия дихромата}}}{D_{\text{флуоксетина}}}$ где $D_{\text{калия дихромата}}$ – оптическая плотность калия дихромата при анализируемых длинах волн, $D_{\text{флуоксетина}}$ – оптическая плотность флуоксетина при данной длине волны, $K_{\text{п}}$ – коэффициент пересчета.

Произведен расчет концентрации флуоксетина по формуле: $C_{\text{флуоксетина}} = D_{\text{флуоксетина}} * K_{\text{п}}$. Концентрация флуоксетина в водном экстракте при pH = 7,0 0,378 мг/мл и общее количество составило – 0,378 мг X 5 (мл) = 1,89 мг.

Заключение. С помощью метода образца сравнения были получены коэффициенты пересчета для спектров дихромата калия и флуоксетина, что позволило рассчитать концентрацию флуоксетина в экстракте капсулы производства (Озон Фарм) РФ. Абсолютные спектры дихромата калия в области 220–240 нм гомологичны абсолютным спектрам флуоксетина и имеют общие пики поглощения. Получены коэффициенты пересчета, которые составили: пик 204,7 нм – 3,388, пик 207,0 нм – 3,638 нм, пик 218,3 нм – 1,150, 228,5 нм – 1,108, пик 230 нм – 0,608, пик 237 нм – 0,596. Концентрация экстракта капсулы флуоксетина при pH 7,0 составила 0,378 мг / мл и общее количество составило – 0,378 мг X 5 (мл) = 1,89 мг.

Ключевые слова: депрессивные расстройства, флуоксетин, спектрофотометрический метод определения.

1. Лазицкая А.М., Илларионова Е.А. Спектрофотометрический анализ флуоксетина // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2016. – Т.140. – С. 22 – 25.
2. Илларионова Е.А., Чмелевская Н.В., Цыренжапов А.В., Лазицкая А.М., Гончикова Ю.А. Изучение распределения (±)-N-метил-3-фенил-3-(пара-трифторметил) феноксипропиламина гидрохлорида в организме теплокровных животных // Судебно-медицинская экспертиза. – 2021. – № 1 – С. 34 – 37.

УДК: 547.853+577.2

Изменение молекулярных маркеров воспаления при профилактике и лечении экспериментального фиброза печени крысы

Г.П. Беляев, А.Б. Выштакалюк, А.А. Парфенов, И.В. Галяметдинова,
В.Э. Семенов, В.В. Зобов

E-mail: gregoir4@gmail.com.

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, 420088, Россия

Введение. Фиброз печени является хроническим патологическим состоянием, при котором нормально функционирующая ткань печени замещается на соединительнотканые волокна, в том числе коллаген, вследствие длительного воспалительного процесса или повреждения органа. Причинами развития фиброза печени могут являться вирусы, токсические агенты, лекарственные средства и др. Прогрессирование фиброза может приводить к развитию необратимой стадии поражения печени – циррозу. В свою очередь такие осложнения цирроза, как гепатоцеллюлярная карцинома, печеночная недостаточность, приводят к гибели большого числа людей во всем мире. При этом эффективной терапии хронических заболеваний печени в настоящее время не существует [1, 2].

Данное исследование посвящено изучению антифиброзных свойств производных пириимидина Ксимедона (1,2-дигидро-4,6-диметил-1-(2-гидрокси этил)-пириимидин-2-она) и его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой, для которых уже были показаны гепатопротекторные свойства на моделях острого токсического гепатита [3]. Вследствие высокой биологической активности производные пириимидина могут рассматриваться в качестве перспективных молекул для создания эффективных гепатопротекторов, в том числе с антифиброзной активностью [4]. Таким образом, целью данной работы являлось изучение антифиброзных свойств Ксимедона и его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой при профилактике и лечении экспериментального фиброза печени крыс, а также их влияния на молекулярные маркеры воспаления в ткани печени.

Материалы и методы. Фиброз печени моделировали на 60 самках крыс линии Wistar, которым в течение 8 недель перорально вводили 5%-ный масляный раствор четыреххлористого углерода (CCl_4) в дозе 2 мл/кг 2 раза в неделю. Поилки животных на протяжении всего опыта содержали 5%-ный раствор этанола. Для профилактики фиброза опытным группам за 1 неделю до начала моделирования фиброза и в течение последующих 8 недель на фоне воздействия CCl_4 +этанола ежедневно внутрибрюшинно вводили Ксимедон в дозе 0.24 мг/кг и конъюгат Ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой в дозе 0.5 мг/кг. В случае лечебной схемы опыта, спустя 8 недель моделирования фиброза, проводили отмену введения CCl_4 +этанола и осуществляли лечение Ксимедоном в дозе 0.24 мг/кг и конъюгатом Ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой в дозе 0.5 мг/кг в течение 2 недель. В контрольной группе вводили эквивалентный объем физиологического раствора.

Ткань печени фиксировали в 10%-ном забуференном формалине, проводку осуществляли с помощью гистопроцессора Sakura Tissue-Tek VIP 5 (Sakura, Япония) Гистопатологический анализ проводили по стандартным методикам с окраской ткани печени по методу Ван-Гизона для выявления волокон коллагена. Количественную оценку молекулярных маркеров воспаления в гомогенатах ткани печени проводили с помощью мультиплексного иммуноферментного анализа MagPix Luminex (MerkMillipore, США). Гомогенаты получали путем лизирования, количество белка определяли методом Бредфорда.

Результаты. Одним из ключевых признаков фиброза является увеличение количества коллагеновых волокон в ткани печени. Было показано, что при моделировании фиброза с помощью CCl_4 и этанола в течение 2 месяцев в контрольной группе значимо ($p < 0.0001$) увеличивалась площадь коллагеновых волокон в 6 раз по сравнению с интактной группой. Профилактическое введение Ксимедона и его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой привело к значимому ($p < 0.0001$) снижению формирования коллагеновых волокон в 3 раза по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о наличии у этих веществ антифиброзного эффекта.

В случае лечения фиброза было показано, что через 2 недели после прекращения введения CCl_4 +этанол в контрольной группе наблюдалась частичная самодеградация коллагеновых волокон, которая достигла хронического уровня, превышающего показатели интактной группы в 2.5 раза ($p < 0.0001$). Лечение Ксимедоном в течение 2 недель не ускорило ремоделирование коллагеновых волокон. Однако введение конъюгата Ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой за тот же период привело к значительному ($p < 0.0001$) снижению площади коллагена в ткани печени на 41% по сравнению с Ксимедоном и контрольной группой.

Исследовался также цитокиновый профиль в ткани печени крыс, поскольку воспалительный процесс тесно связан с развитием фиброза [5]. Результаты показали, что при моделировании фиброза путем введения CCl_4 +этанол в течение 2 месяцев наблюдался дисбаланс цитокинового профиля печени. Произошло значимое снижение уровней провоспалительных цитокинов TNF α в 2 раза ($p = 0.004$), IL-1 α в 1.7 раз ($p = 0.005$), а также противовоспалительных цитокинов IL-2 в 2 раза ($p = 0.002$), IL-12 в 1.9 раз ($p = 0.0001$), при этом уровень фактора роста фибробластов (FGF-2) увеличился в 2.2 раза ($p = 0.0005$) по сравнению с интактной группой.

Профилактическое введение Ксимедона и его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой на фоне воздействия CCl_4 +этанол способствовало значительному восстановлению баланса цитокинов и уровня фактора роста фибробластов до показателей, близких к интактной группе. При этом более выраженный эффект наблюдался у конъюгата Ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой. При лечении фиброза в контрольной группе с моделированным фиброзом печени спустя 2 недели после отмены CCl_4 +этанол произошло частичное самовосстановление уровней воспалительных маркеров, приближенных к значениям интактного контроля. Однако лечение фиброза конъюгатом Ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой имело тенденцию к более выраженному восстановлению цитокиновых показателей по сравнению с контрольной группой и самим Ксимедоном.

Заключение. Таким образом, Ксимедон и его конъюгат с *L*-аскорбиновой кислотой обладают антифиброзными свойствами при профилактике фиброза печени крыс, восстанавливая дисбаланс цитокинового профиля в печени крысы. При этом, конъюгат Ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой оказывал более выраженный эффект, в том числе при лечении фиброза.

Ключевые слова: фиброз печени, молекулярные маркеры, Ксимедон, *L*-аскорбиновая кислота.

Работа выполнена в рамках финансирования Государственного задания № 122011800131-8 Федерального исследовательского центра «Казанского научного центра Российской академии наук».

1. Akkız H., Gieseler R.K., Canbay A. Liver fibrosis: from basic science towards clinical Progress, focusing on the central role of hepatic stellate cells // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – V. 25. – №. 14. – P. 7873.
2. Thiele M., Pose E., Juanola A., Mellinger J., Ginès P. Population screening for cirrhosis // Hepatology communications. – 2024. – V. 8. – P. e0512.
3. Выштакалюк А.Б., Семенов В.Э., Зобов В.В., Галяметдинова И.В., Гумарова Л.Ф., Парфенов А.А. и др. Синтез и первичная оценка гепатопротекторных свойств новых производных пиримидинового ряда // Биоорганическая химия. – 2017. – Т. 43. – №. 5. – С. 572 – 580.
4. Natarajan R., Anthoni Samy H.N., Sivaperuman A., Subramani A. Structure-activity relationships of pyrimidine derivatives and their biological activity-a review // Medicinal Chemistry. – 2023. – V. 19. – P. 10 – 30.
5. Hammerich L., Tacke F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis // Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. – 2023. – V. 20. – P. 633 – 646.

УДК: 571.27

Изучение механизма действия рапамицина на регуляцию иммунного ответа при тиреоидите Хашимото

А.В. Бурцева, А.Н. Тихонова, М.В. Тихомирова, С.Н. Абрамов, З.И. Абрамова

E-mail: a.burtseva00@gmail.com.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Тиреоидит Хашимото, или аутоиммунный тиреоидит, является наиболее распространенным аутоиммунным заболеванием, связанным с лимфоцитарной инфильтрацией и высоким уровнем аутоантител к щитовидной железе, что приводит к гипотиреозу [1]. Заместительная терапия тироксином не устраняет корень проблемы – активность аутореактивных Т-лимфоцитов и хроническое воспаление щитовидной железы, и не предотвращает развитие ассоциированных аутоиммунных и онкологических заболеваний [2]. Киназа mTOR играет решающую роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний, поскольку участвует в ремоделировании тканей и повреждении органов иммунными клетками. Рапамицин, ингибитор mTOR, показывает эффективность в лечении аутоиммунных заболеваний и может быть перспективным средством для терапии тиреоидита

Хашимото [3]. На основании всех этих данных была поставлена цель: охарактеризовать механизм действия рапамицина на модуляцию иммунного ответа при тиреоидите Хашимото.

Материалы и методы. Индукция классического экспериментального аутоиммунного тиреоидита (ЭАТ) проводилась иммунизацией тиреоглобулином и кормлением водой с высоким содержанием йода для повышения иммуногенности. 19 самок мышей C57BL/6 в возрасте 7 недель были разделены на контрольную группу (n = 5), группу модели заболевания (n = 7) и группу лечения рапамицином (n = 7). В группе лечения рапамицин вводили внутри брюшинно по 1 мг/кг 3 раза в неделю в течение 5 недель. Группа с ЭАТ и контрольная группа получали PBS. Изучались степень инфильтрации и разрушение фолликулов щитовидной железы, уровень апоптоза фолликулярных клеток методом иммуногистохимии, а также влияние рапамицина на дифференцировку и апоптоз тимоцитов и количество тимических Т-регуляторных лимфоцитов методом проточной цитометрии. Измерялись уровни антител к тиреоидной пероксидазе с использованием иммуноферментного анализа, а также был проведен анализ секреции провоспалительных цитокинов методом проточной цитометрии.

Результаты. Рапамицин снижал уровень воспаления щитовидной железы при тиреоидите Хашимото (степень лимфоцитарной инфильтрации и продукцию аутоантител к тиреопероксидазе) и апоптоза щитовидной железы. Лечение рапамицином предотвращало инволюцию тимуса, увеличивая количество DP-клеток и тимических Т-регуляторных клеток (tTreg), а также подавляло секрецию провоспалительных цитокинов IFN- γ и IL-17a в спленоцитах мышей при экспериментальном аутоиммунном тиреоидите.

Заключение. Суммируя полученные данные, применение рапамицина снижало аутоиммунное воспаление щитовидной железы и предотвращало развитие тиреоидита Хашимото у мышей с экспериментальным аутоиммунным тиреоидитом.

Ключевые слова: рапамицин, тиреоидит Хашимото, апоптоз, аутоантитела к тиреопероксидазе, провоспалительные цитокины.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (№ 23-25-00443).

1. Boutzios G., Koukouloti E., Goules A.V., Kalliakmanis I., Giannopoulos I., Vlachoyiannopoulos P., Tzioufas A.G. Hashimoto thyroiditis, anti-parietal cell antibodies: associations with autoimmune diseases and malignancies // *Frontiers in endocrinology*. – 2022. – V. 13. – P. 860880.
2. Antonelli A., Benvenga S. The association of other autoimmune diseases in patients with thyroid autoimmunity // *Frontiers in Endocrinology*. – 2018. – V.9. – P. 540.
3. Wen H.Y., Wang J., Zhang S.X., Luo J., Zhao X.C., Zhang C., Li X.F. Low-dose sirolimus immunoregulation therapy in patients with active rheumatoid arthritis: a 24-week follow-up of the randomized, open-label, parallel-controlled trial // *Journal of immunology research*. – 2019. – V. 19.

Анализ некоторых показателей специфического иммунитета защитных функций слюны

Л.А. Ганеева, Ю.В. Скибо

E-mail: kolbatonalilya@mail.ru

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Слюна человека является уникальной субстанцией, по мнению ряда авторов, является полноценным органом иммунной системы [1,2]. Анализ компонентов слюны все чаще используют в медицине как самый безопасный и не инвазивный метод диагностики. Защитные функции слюны определяются неспецифическими факторами и некоторыми показателями специфического иммунитета [3]. Важнейшим компонентом слюны являются белковые соединения, значительную часть которых условно можно разделить по своим функциональным свойствам на три группы: участвующие в пищеварительных процессах, связанные с местным иммунитетом и выполняющие регуляторные функции.

Белки, участвующие в пищеварительных реакциях, представлены гидролитическими ферментами, основным из которых является α -амилаза, которая может составлять до 10% всех белков слюны. Кроме амилазы в состав слюны входят такие пищеварительные ферменты как: мальтаза, гиалуронидаза, трипсиноподобные ферменты, пепсиноген, пептидазы, эстеразы, липазы, нуклеазы, пероксидазы, кислые и щелочные фосфатазы, лактопероксидаза и т.д. Показано, что практически для всех этих ферментов характерна иммунопротекторная активность. Иммуноглобулины слюны представлены в основном иммуноглобулином А и в меньшей степени IgG, IgM [2] и IgE [4].

Показано, что лактоферрин участвует в различных реакциях защиты организма и регуляции иммунитета [3]. В антимикробном действии важную роль играют фосфопротеины, гистатины и статерины. Цистатины являются ингибиторами цистеиновых протеиназ и могут выполнять защитную роль при процессах воспаления в ротовой полости. Муцины – крупные гликопротеины, которые в основном обеспечивают вязкую природу слюны – запускают специфическое взаимодействие между стенкой бактериальных клеток и комплементарными галактозидными рецепторами на мембране эпителиальных клеток. Подобные свойства обнаружены также у амилазы, фибронектина и β_2 -микроглобулина [1,3]. Целью данного исследования является оценка количества иммуноглобулинов, альфа-амилазы и лизоцима и их динамика в образцах слюны доноров.

Материалы и методы. Для исследования были отобраны 30 образцов слюны пациентов, не имевших явных общих признаков инфицирования, а также признаков воспаления в полости рта. Определение активности амилазы в слюне проводили методом распада субстрата - крахмала (метод Вольгемута). Количественное определение иммуноглобулинов А и G в слюне исследовались турбодиметрическим методом. Активность лизоцима в слюне определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле.

Результаты. Концентрация иммуноглобулина G составила от 0,23 до 26,1 мг/мл, что соотносится с нормальными значениями. Что касается IgA, концентрация варьировала от 39 до 662 мг/мл. Такое повышение концентрации IgA, в слюне согласуется с данными, подтверждающими роль иммуноглобулинов, которые обеспечивают стабильную защиту ротовой полости от инфекции. Активность альфа-амилазы в образцах слюны варьировалась от 80 до 650 ед. Концентрация лизоцима варьировала от 10 до 160 мг/мл. В эксперименте «выпадающими» оказались образцы слюны трех пациентов, которые были отмечены очень низкими показателями активности альфа-амилазы и концентрацией лизоцима, напротив, очень высокая концентрация иммуноглобулина A преобладала в этих образцах. По имеющимся данным, пациенты у которых были отобраны образцы слюны, через трое суток заболели коронавирусом инфекции.

Заключение. Анализируя полученные экспериментальные данные, можно с достаточной долей уверенности утверждать, что исследование иммунологических специфических факторов слюны имеет большое значение для оценки неспецифической резистентности организма, первичного иммунодефицита. Иммунологические специфические факторы слюны могут служить определенными маркерами острых и хронических заболеваний.

Ключевые слова: слюна, иммуноглобулины G и A, альфа-амилаза, лизоцим, молекулярные маркеры.

1. Mandel I.D. The role of saliva in maintaining oral homeostasis // J.Am.Dent.Assoc. – 2019. – V. 119 (2). – P. 298 – 304.
2. Amerongen A. V. Saliva-the defender of the oral cavity // Oral.Dis. –2020. –V. 8 (1). – P. 12 – 22.
3. Кудрин А.В., Громова О.А. // Микроэлементы в иммунологии и онкологии. – 2008. Из-во ГЭОТАР Медицина.
4. Игнатова В.К. Изменение структурных свойств слюны при изменении pH // Стоматология. – 2019. – V. 2. – С. 22 – 24.

УДК: 577.29

Измерение выработки активных форм кислорода LC3-ассоциированного фагоцитоза в моноцитах больных бронхиальной астмой

**Б. Р. Ибрагимов¹, А.С. Демерцидис¹, Ю.В. Скибо¹, М.В. Тихомирова¹,
С.Н. Абрамов¹, И.Д. Решетникова^{1,2}, З.И. Абрамова¹**

E-mail: Ibragimov94@inbox.ru.

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

²ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора, г.Казань, 420015, Россия

Введение. Макрофаги уничтожают бактерии, аллергены и другие внеклеточные патогены посредством антимикробных реакций, сопряженных с фагоцитозом, таких как генерация активных форм кислорода и доставка гидролитических ферментов из лизосом в фагосому [4]. При распознавании и фагоцитозе внеклеточных патогенов запускается ряд защитных реакций. Запускается фагоцитоз, связанный с

белком LC3, который получил название LC3- ассоциированный фагоцитоз (LAP) [1]. В зависимости от активных форм кислорода (АФК), продуцируемых НАДФН-оксидазой 2 (Nox2), белок LC3 связанный с аутофагией встраивается в структуру одномембранных фагосом [4]. АФК продуцируемые НАДФН-оксидазой (Nox2), которые задействованы в механизме LC3-ассоциированного фагоцитоза участвуют в развитии врожденных и адаптивных иммунных реакций, что приводит, в том числе, к ремоделированию дыхательных путей и гиперреактивности [2]. Тем не менее роль АФК в LC3-ассоциированном фагоцитозе при бронхиальной астме изучена недостаточно. Целью настоящей работы является определение АФК в моноцитах больных atopической бронхиальной астмы.

Материалы и методы. Активацию АФК определяли в моноцитах здоровых доноров и больных atopической бронхиальной астмой методом проточной цитометрии с использованием анализа DHR-123, согласно описанной ранее методологии [3]. Анализ медианы и геометрического среднего (gMean) интенсивности флуоресценции родамина-123 (Rho123) проводили в программе FLOWJO. Статистический анализ результатов проводили с помощью t - критерия Стьюдента [3].

Результаты. Стимуляция РМА вызывала значительное увеличение флуоресценции родамина во всех исследуемых группах. Медианное значение флуоресценции канала (FL1) в группе здоровых доноров составило 19, тогда как для легкой БА – 45,7, для средней БА – 77,5, а для группы больных тяжелой БА – 94. Геометрическое среднее флуоресценции в группе здоровых доноров – 22,75, в группе больных легкой БА – 54,6; в группе больных средней БА – 77,6; в группе тяжелой БА – 92,4.

Заключение. Исходя из полученных данных можно предположить, что с отягощением тяжести заболевания бронхиальной астмы происходит избыточное производство АФК комплексом Nox2 (НАДФН-оксидаза 2) механизма LC3-ассоциированного фагоцитоза в фагоцитирующих клетках.

Ключевые слова: активные формы кислорода, LC3-ассоциированный фагоцитоз, бронхиальная астма, фагоцитоз.

1. Ibragimov B.R., Skibo Yu.V., Abramova Z.I. Autophagy and LC3-associated phagocytosis: similarities and differences // Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya. – 2023. – V. 25. – P. 233 – 252.
2. Michaeloudes C., Abubakar-Waziri H., Lakhdar R., Raby K., Dixey P., Adcock I.M., Mumby S., Bhavsar P.K., Chung K.F. Molecular mechanisms of oxidative stress in asthma // Molecular Aspects of Medicine. – 2022.
3. Pioch J., Blomgran R. Optimized flow cytometry protocol for dihydrorhodamine 123-based detection of reactive oxygen species in leukocyte subpopulations in whole blood // Journal of Immunological Methods. – 2022.
4. Sweet M.J., Ramnath D., Singhal A., Kapetanovic R. Inducible antibacterial responses in macrophages // Nature Reviews Immunology. – 2024.

Оценка влияния цитохалазин-индуцированных микровезикул на миграцию и пролиферацию эпителиальных клеток почки *in vitro*

А.И. Квон, В.Ю. Сыромятникова, М.О. Гомзикова

E-mail: dojnikova1998@mail.ru

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Острое повреждение почек (ОПП) – серьезная проблема общественного здравоохранения, затрагивающая миллионы людей во всем мире, распространенность которой быстро возросла в последние годы. Недостатки существующих подходов к лечению ОПП определяют необходимость совершенствования и поиска новых эффективных терапевтических инструментов в клинической практике. Клеточная терапия мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) выступает в качестве потенциального способа лечения ОПП. Однако их клиническое применение связано с риском спонтанной трансформации в злокачественные клетки, накоплением генетических и эпигенетических изменений при пролиферации *in vitro*. С целью преодоления вышеописанных рисков для стимуляции регенерации тканей почек в настоящее время активно исследуются бесклеточные подходы с использованием микровезикул (МВ). Таким образом, целью данного исследования является оценка влияния цитохалазин-индуцированных МВ на миграцию и пролиферацию клеток почечных канальцев мыши (ТЕС – tubular epithelial cells) *in vitro*.

Материалы и методы. Влияние цитохалазин-индуцированных МВ на миграцию и пролиферацию ТЕС оценивали с помощью метода царапины (Scratch Assay) по протоколу, описанному Martinotti S. и Ranzato E. [1].

В лунки 12-луночного планшета высевали по 100 тыс. ТЕС мыши. На следующий день создали царапины в монослое клеток, используя наконечник пипетки. После формирования царапины аккуратно промывали клеточный монослой для удаления открепившихся клеток. Производили замену среды на свежую, содержащую 1% FBS, и цитохалазин-индуцированные МВ, полученные от 200 тыс. МСК жировой ткани, по протоколу, описанному ранее [2]. В качестве контроля служили клетки, в которые добавляли только питательную среду с 1% FBS. Клетки поместили в стандартные условия инкубатора для клеточных культур. Оценку миграции и пролиферации производили в 2 временных точках – 16 и 20 ч. Анализ изображений производили с помощью программного обеспечения ImageJ.

Результаты. Спустя 16 ч инкубации культуры ТЕС с МВ расстояние между краями царапины сократилось на 72,2%, а через 20 ч на 100%, в то время как в контроле через 16 ч расстояние между краями царапины сократилось на 16,7%, а через 20 ч – 36,1%.

Заключение. Таким образом, цитохалазин-индуцированные МВ МСК увеличивали скорость миграции и пролиферативную активность ТЕС, что может стимулировать регенерацию тканей при ОПП.

Ключевые слова: микровезикулы, цитохалазин, повреждения почек, регенерация.

Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

1. Martinotti S., Ranzato E. Scratch Wound Healing Assay // Methods Mol Biol. – 2020. – V. 2109. – P. 225 – 229.
2. Gomzikova M.O., Zhuravleva M.N., Miftakhova R.R., Arkhipova S.S., Evtugin V.G., Khaiboullina S.F., Kiyasov A.P., Persson J.L., Mongan N.P., Pestell R.G., Rizvanov A.A. Cytochalasin B-induced membrane vesicles convey angiogenic activity of parental cells // Oncotarget. – 2017. – V. 8 (41). – P. 70496 – 70507.

УДК:579.61

Анализ циторегуляторных свойств серологически активных антигенов микобактерий

М.О.Коровина^{1,2}, Ю.В.Филина², К.С.Хаертынов¹, А.Г.Габдулхакова^{1,2}

E-mail: kororulina.mo@gmail.com

¹ Казанская государственная медицинская академия – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Казань, 420012, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия,

Введение. Туберкулез остается серьезной глобальной угрозой общественному здравоохранению, вызывая, по оценкам Всемирной организации здравоохранения, 10,4 млн новых случаев заболевания и 1,4 млн смертей в год. Туберкулез распространен во всех странах и возрастных группах. Российская Федерация входит в список 22 стран с высоким бременем туберкулеза, на которые приходится около 80% случаев данного заболевания в мире [1]. Ранний иммунный ответ, опосредованный клетками врожденной иммунной системы, такими как нейтрофилы и макрофаги, имеет решающее значение для защиты хозяина от микобактериальной инфекции. Некоторые секретируемые и мембранные белки микобактерий способны «обезоруживать» иммунные клетки за счет подавления слияния фагосом и лизосом и привлечения мембранных белков, таких как V-АТФаза и НАДФН-оксидаза в фагосому, а также за счет блокады презентации антигенов белками МНС II на поверхности плазматической мембраны [2]. Целью работы была оценка влияния серологически активных полипептидов *Mycobacterium bovis* на функции гранулоцитов.

Материалы и методы. В работе использовались фракции, обладающие наибольшей серологической активностью, которые представляли собой полипептиды с молекулярной массой 10, 22, 24, 40 кДа (АГ1-4, соответственно). В качестве группы сравнения были использованы синтетические полипептиды, содержащие иммуногенные эпитопы антигена МРВ 70 *M. bovis*, обозначенные как антигены АГ5 и АГ6. Гранулоциты выделяли из костного мозга мышей-самцов линии BALB/c (8–12 недель, 20–25 г), полученных из питомника филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» России. Условия работы с животными соответствовали нормативно-правовому акту Министерства здравоохранения РФ №199-н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики, международно-правовыми нормами, указанных в Европейской конвенции ETS № 123 «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» и руководству по работе с лабораторными животными ИБК РАН №57.30.12.2011. В работе также были использованы клетки линии ТНР-1 (клетки моноцитарного происхождения от пациента с острой моноцитарной лейкемией) и А549 (производные альвеолярных базальных эпителиальных клеток, выделенные у пациента с аденокарциномой легких). Клетки культивировали во влажной атмосфере 5% CO₂ и 37 °С в культуральной среде DMEM (А549) или RPMI-1640 (ТНР-1) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина и 1% пенициллина/стрептомицина (Панэко, Россия). Цито-токсичность при 20-минутной инкубации клеток с антигенами оценивали при помощи окрашивания пропидий йодидом (PI). Влияние антигенов на пролиферацию и жизнеспособность клеток линии А549 и ТНР-1 оценивали с помощью МТТ-теста (МТТ реагент от Панэко, Россия), отражающего метаболическую активность культивируемых адгезивных клеток. Клетки ТНР-1 предварительно дифференцировали 10 нМ РМА в течение 48 ч. Для измерения продукции активных форм кислорода (АФК) использовали метод люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ). При оценке действия антигенов в пробы добавляли антиген или растворитель (контрольные образцы). Исходная концентрация антигенов, мг/мл: АГ1 – 0,083; АГ-2 – 0,08; АГ3 – 0,059; АГ4 – 0,23; АГ5 – 1,0; АГ6 – 1,0. Для стимуляции клеток использовали формилирован-ный пептид fMLF (N-формил-L-метионил-L-лейцил-L-фенил-аланин, 10⁻⁵ М, агонист FPR), опсонизированный зимозан (ОЗ, 5 мг/мл, агонист FcR) и форбол-12-миристат-13-ацетат (РМА, 10⁻⁶ М, синтетический аналог диацилглицерина, способный проникать через клеточную мембрану и напрямую активировать PKC). Измерения проводили в трёх технических повторах и не менее чем в трех биологических повторах.

Результаты. Оценка оксидазной активности показала, что в ответ на добавление к изолированным гранулоцитам мыши антигены АГ 1-3 вызывали дозозависимую продукцию АФК, тогда как АГ4 и синтетические АГ5-6 не обладали такой способностью. Предобработка гранулоцитов мыши полипептидами АГ1 и АГ4 привела к достоверному снижению ответа при последующей стимуляции fMLF и ОЗ, но к усилению ответа при стимуляции РМА по сравнению с необработанными клетками ($p < 0.0001$). Предобработка клеток полипептидами АГ2 и АГ3 вызывала достоверное усиление респираторного ответа при последующей

стимуляции fMLF по сравнению с контролем ($p < 0.001$). При этом предобработка полипептидом АГ2 вызвала снижение ответа при стимуляции ОЗ ($p < 0.01$), в то время как АГ3 такого влияния не оказывал. Не выявлено различий ответов на РМА между гранулоцитами, обработанных антигенами 2 и 3, и контрольными. В гранулоцитах, предварительно инкубированных с синтетическими антигенами АГ5 и АГ6, не было обнаружено изменений уровня генерации активных форм кислорода ни на один из последующих стимулов. Была проведена оценка цитотоксичности антигенов при кратковременном воздействии (20 мин) и при продолжительной инкубации (48 и 72 ч). Мы не выявили статистически достоверных различий в уровне цитотоксичности антигенов при 20-минутной инкубации клеток ТНР-1 и А549 по сравнению с контрольными (растворитель) клетками. Также, после 48 ч инкубации клеток линии А549 и дифференцированных клеток ТНР-1 с антигенами АГ1-5 не было обнаружено достоверного изменения количества жизнеспособных клеток по сравнению с контрольными клетками. Стоит отметить, что АГ5 и АГ6 вызвали достоверное повышение количества жизнеспособных клеток в культуре А549 (72 ч) ТНР-1 (48 ч), соответственно, ($p \leq 0.05$).

Заключение. Проведенный анализ серологически активных микобактериальных белков продемонстрировал, что выделенные полипептиды с молекулярной массой 10, 22, 24, 40 кДа способны самостоятельно запускать продукцию АФК гранулоцитами мыши, а также при предварительной обработке клеток модулируют оксидазную активность при последующей стимуляции агонистами FPR- и FcR-рецепторов и РМА, прямым активатором РКС. Мы предполагаем, что способность самостоятельно активировать продукцию АФК гранулоцитами, как и модуляция вызванных ответов, реализуются за счет взаимодействия с поверхностными рецепторами. Полипептиды не оказывали цитотоксического действия при кратковременной инкубации и не влияли на жизнеспособность клеток линии А549 и дифференцированных клеток линии ТНР-1 при долговременной инкубации.

Ключевые слова: туберкулез, *Mycobacterium bovis*, гранулоциты, активные формы кислорода.

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2021. Режим доступа: <https://www.who.int/publications/digital/global-tuberculosis-report-2021>. [17.10. 2024].
2. Alcantara C.A., Glassman I., Nguyen K.H., Parthasarathy A., Venketaraman V. Neutrophils in *Mycobacterium tuberculosis*// *Vaccines*. – 2023. – V. 11. – P. 631.

**Характеристика первичной культуры микроглии, выделенной
из коры головного мозга новорожденных крысят**

Э.И. Насыбуллина, А.В. Тимофеева, А.А. Гарифуллина, Э.Р. Ахметзянова

E-mail: Evelineva28@gmail.com

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. В последние годы наблюдается постоянный рост интереса к различным аспектам функционирования микроглии [1]. Изучение первичной микроглии, как в изолированной культуре, так и в культуре, содержащей нейроны или астроциты, позволяет глубже понять механизмы реакций, происходящих в микроглии в норме и при патологии, а также выявить взаимосвязи между различными типами клеток в центральной нервной системе [2]. Микроглия играет ключевую роль в поддержании гомеостаза и нейропластичности благодаря своей способности контролировать состояние нервной ткани, фиксировать нейронную активность или дисфункцию, удалять синапсы во время развития, фагоцитировать нейронные отростки, а также регулировать мозговой кровоток.

Кластеры дифференцировки (CD-антигены) представляют собой белковые молекулы, служащие рецепторами или лигандами, участвующими во взаимодействии клеток между собой и являющимися компонентами сигнальных каскадов. Благодаря кластерам дифференцировки удобно классифицировать различные типы клеток, в том числе и микроглию, поскольку она экспрессирует различные CD-антигены, которые определяют идентичность данных клеток и их функции. Целью данной работы было проанализировать первичную культуру микроглии, выделенную из коры головного мозга новорожденных крысят, на экспрессию белков CD45, CD86, CD40 и CD163, являющихся маркерами исследуемых клеток.

Материалы и методы. Клетки микроглии были получены из коры головного мозга новорожденных трехдневных крысят, поскольку в развивающейся коре головного мозга находится пул микроглии, который резко сокращается уже после 7 сут постнатального развития. После выделения клетки сразу забирались для анализа методом проточной цитометрии.

Результаты. Полученные результаты показали, что экспрессия трансмембранного белка CD45 в первичной культуре микроглии незначительна (1,3%), что отличает ее от других миелоидных клеток. Низкая экспрессия CD40 (1,6%) позволяет предположить, что микроглия, скорее всего, находилась в состоянии покоя. Также было выяснено, что экспрессия CD86 очень высока – 99,9%, что свидетельствует о том, что полученная нами культура является чистой. По полученным данным коэкспрессия CD40 и CD86high равна 1,5%, а CD40 и CD86low – 97,9%, из чего можно сделать вывод о том, что количество активированной микроглии минимально, так как экспрессия CD40 и CD86high характерна для активированной микроглии.

Заключение. Исходя из представленных данных, можно сделать вывод, что исследуемая первичная культура микроглии, выделенная из коры головного

мозга новорожденных крысят, демонстрирует ряд особенностей, характерных для клеток в состоянии покоя. Результаты нашего исследования позволяют предположить, что микроглия в исследуемой культуре находилась в относительно неактивном состоянии, и процедура выделения не оказывала значительного влияния на фенотип клеток, что делает их ценным объектом для дальнейших исследований, направленных на изучение функций микроглии.

Ключевые слова: микроглия, первичная культура, CD45, CD86, CD40.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда, № 23-24-00348, <https://rscf.ru/en/project/23-24-00348/>

1. Korzhevskii D.E., Kirik O.V. Brain microglia and microglial markers // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2016. – V. 46. – P. 284 – 290.
2. Pesti I., Légrádi Á., Farkas E. Primary microglia cell cultures in translational research: strengths and limitations // Journal of Biotechnology. – 2024.

УДК: 57.045

Уровень продукции малонового диальдегида в диафрагмальной мышце мышей после моделируемой гипогравитационной разгрузки и реадаптации

А.Е. Павлов¹, О.В. Тяпкина²

E-mail: alexandr.pavlov.off@yandex.ru.

¹*Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия*

²*КИББ КазНЦ РАН – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, 420111, Россия*

Введение. В условиях реальной и моделируемой гипогравитации у животных и человека развиваются нарушения в работе практически всех органов и систем. Одной из многочисленных реакций, развивающихся в организме в ответ на пребывание в условиях космического полета, является изменение редокс-статуса, что может приводить к активации процессов повреждения клеток и органов, так и включать протекторные механизмы. Например, при развитии гипогравитационного двигательного синдрома (ГДС) активация атрофии в скелетных мышцах каспазами, запускается повышенным уровнем окислительного стресса [1].

Диафрагмальная мышца у млекопитающих и человека является основной дыхательной мышцей и нарушения в ее работе могут вызывать дыхательную недостаточность. Ранее нами было выявлено изменение редокс-статуса в этой мышце у мышей, находящихся в условиях реального космического полета [2].

Целью настоящей работы явилось исследование уровня малонового диальдегида (МАД) – продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) после 28-суточного моделирования эффектов гипогравитации на Земле и последующей 3-су-

точной реадаптации. Полученные результаты позволят оценить степень перекисного окисления липидов и вовлеченности изменения редокс-статуса в патогенез развития нарушений при ГДС.

Материалы и методы. Все процедуры с животными одобрены Комиссией по Биоэтике Федерального исследовательского центра Казанского научного центра Российской академии наук (протокол № 12-3 от 28.02.2023 г.). Модель антиортостатического вывешивания (АОВ) использовали для воспроизведения эффектов космического полета, ведущих к развитию ГДС.

Мышей самцов разделили на 3 группы: Контроль ($n = 5$), Антиортостатическое вывешивание 28 суток ($n = 5$) и Реадаптация 3 суток после 28-суточного АОВ ($n = 5$). Уровень МАД определяли спектрофотометрическим методом по Ohkawa (реакция с 2-тиобарбитуровой кислотой) и выражали в мкг/г ткани. Поглощение супернатанта измеряли при 532 и 560 нм. Статистический анализ проводили с использованием непараметрического теста ANOVA.

Результаты. В ходе проведения экспериментов было установлено достоверное увеличение уровня МАД в диафрагмальной мышце мышей после 28 суток АОВ на 100% по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0.05$). После 3-суточной реадаптации был выявлен повышенный уровень МАД на 65% по сравнению с контрольной группой мышей ($p \leq 0.05$). При этом отсутствовали достоверные различия в концентрации МАД у мышей после 28 суток АОВ и у мышей после 3-суточной реадаптации после 28 суток АОВ.

Заключение. Полученные результаты о повышении уровня МАД в диафрагмальной мышце мышей после моделирования гипогравитации позволяют заключить, что изменяется редокс-статус, что может отразиться на реализации респираторной функции.

Ключевые слова: малоновый диальдегид, диафрагмальная мышца, гипогравитация, реадаптация.

1. Takahashi K., Okumura H., Guo R., Naruse K. Effect of Oxidative Stress on Cardiovascular System in Response to Gravity. // Int J Mol Sci. – 2017. – V. 8(7). – P. 1426. doi: 10.3390/ijms18071426.
2. Tyapkina O.V., Nurullin L.F., Dmitrieva S.A. Changing activity of antioxidant system in respiratory muscle of diaphragma in mice after space flight. // AIP Conference Proceedings. – 2021. – V. 2318. – P. 160008.

**Модификация нигерицином механизма разобщающего действия
литохолеовой кислоты в митохондриях печени**

Е.К. Павлова, В.Н. Самарцев

E-mail: evgewa2010_2011@mail.ru

Марийский государственный университет, г. Йошкар-ола, 424001, Россия

Введение. Литохолеовая кислота (ЛХК) – вторичная желчная кислота, образуется из хенодезоксихолевой кислоты в кишечнике при участии локализованных там бактерий. ЛХК является не только детергентом для эмульгирования в кишечнике, но и токсичной для гепатоцитов [1]. ЛХК рассматривается как канцероген: в высоких концентрациях индуцирует окислительный стресс и повреждение ДНК [2]. В работе исследовано влияние ЛХК на изолированные митохондрии печени крыс, энергизованных путем окисления сукцината в присутствии нигерицина, преобразующего ΔpH в $\Delta\psi$.

Материалы и методы. Митохондрии из печени белых половозрелых крыс самцов выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования [3]. Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом при 25 °С с помощью кислородного электрода типа Кларк [4]. Разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$) на внутренней мембране митохондрий оценивали по распределению катиона тетрафенилфосфония ($TFFP^+$) через внутреннюю мембрану, концентрацию которого регистрировали с помощью $TFFP^+$ -чувствительного электрода [5]. Среда инкубации содержала 200 мМ сахарозы, 20 мМ KCl, 5 мМ янтарной кислоты, 0,5 мМ EGTA и 10 мМ MOPS. При проведении экспериментов в ячейку или в кювету сразу после митохондрий во всех случаях добавляли ротенон (2 мкМ) и, если необходимо, другие добавки.

Результаты. Установлено, что без нигерицина зависимость скорости дыхания от концентраций ЛХК не линейна и описывается параболическим уравнением. При этих условиях специфический ингибитор ADP/ATP-антипортера – карбоксиатрактиллат и субстраты аспаратат/глутаматного антипортера – глутамат (или аспаратат) не влияют на стимулированное этой желчной кислотой дыхание митохондрий. Предполагается, что без нигерицина протонофорное разобщающее действие ЛХК в значительной степени связано с формированием димерной формы – комплекса аниона с кислотой и осуществляется без участия ADP/ATP- и аспаратат/глутаматного антипортеров. Возможно, что часть анионов ЛХК будет постепенно аккумулироваться в матриксе и не участвовать в разобщении. Нигерицин, при повышении $\Delta\psi$ достигающий своей максимальной эффективности, в концентрации 20 нМ, существенно изменяет характер разобщающего действия желчных кислот. В присутствии этого ионофора зависимость скорости дыхания от концентрации желчных кислот линейна, по-видимому, нигерицин препятствует формированию димерной формы этих желчных кислот в процессе разобщения. Карбоксиатрактиллат в существенной степени ингибирует стимулированное ЛХК дыхание, что сопровождается повышением $\Delta\psi$. Отмечается, что как в отсутствие, так и в присутствии нигерицина

разобщающее действие ЛХК не связано с увеличением проницаемости для моновалентных катионов.

Заключение. Полученные результаты рассматриваются как свидетельство того, что: 1) без нигерицина зависимость скорости дыхания от концентраций ЛХК не линейна и описывается параболическим уравнением; 2) в присутствии нигерицина, т.е. при условии превращения ΔpH в $\Delta \psi$, разобщающее действие ЛХК осуществляется главным образом при участии ADP/АТФ-антипортера. Обсуждаются возможные механизмы разобщающего действия желчных кислот при участии этого переносчика.

Ключевые слова: литохолевая кислота, нигерицин, митохондрии печени крыс, дыхание.

1. Doden H.L., Wolf P.G., Gaskins H.R., Anantharaman K., Alves J.M.P., Ridlon J.M. Completion of the gut microbial epi-bile acid pathway // *Gut Microbes*. – 2021. – V. 13. – P. 1 – 20.
2. Nguyen D., Zaitseva T.S., Zhou A., Rochlin D., Sue G., Deptula P. et al. Lymphatic Regeneration after Implantation of Aligned Nanofibrillar Collagen Scaffolds: Preliminary Preclinical and Clinical Results // *J. Surg. Oncol.* – 2021. – V. 2. – P. 113 – 122.
3. Samartsev V.N., Smirnov A.V., Zeldi I.P., Markova O.V., Mokhova E.N., Skulachev V.P. Involved of aspartate/glutamate antiporter in fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1997. – V. 1339. – P. 251 – 257.
4. Dubinin M.V., Semenova A.A., Ilzorkina A.I., Markelova N.Y., Penkov N.V., Shakurova E.R., Belosludtsev K.N., Parfenova L.V. New quaternized pyridinium derivatives of betulin: Synthesis and evaluation of membranotropic properties on liposomes, pro- and eukaryotic cells, and isolated mitochondria // *Chem. Biol. Interact.* – 2021. – V. 349. – P. 109678.
5. Kamo N., Muratsugu M., Hondoh R., Kobatake Y. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenylphosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state // *J. Membr. Biol.* – 1979. – V. 49. – P. 105 – 121.

УДК: 577.1

Роль гистон-метилтрансферазы NSD1 в регуляции онкогенной передачи сигналов при ВПЧ-негативной плоскоклеточной карциноме головы и шеи

Ю.А. Топчу¹, И.Н. Бычков¹, З.И. Абрамова², Э.Р. Булатов², Я.А. Бумбер^{1,3}

E-mail: iuliia.topchu@gmail.com

¹Северо-Западный университет, г. Чикаго, 60611, США;

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

³Университет Алабамы, г. Бирмингем, 35294, США

Введение. Плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) занимает шестое место среди наиболее распространенных видов рака в мире. Несмотря на достижения в области химиотерапии и иммунотерапии, пятилетняя выживаемость при ПРГШ остается на уровне около 66% для всех диагностированных случаев. Выявление ключевых факторов, вызывающих ВПЧ-отрицательный ПРГШ, и определение це-

левых точек уязвимости опухоли может проложить путь к значительному клиническому прогрессу. Одной из потенциальных мишеней является гистон-метилтрансфераза NSD1, которая катализирует диметилирование лизина 36 гистона H3 (H3K36me2). Повреждающие мутации, приводящие к инактивации NSD1, связаны с улучшением клинических исходов у пациентов с ПРГШ. Эти данные указывают на важность дальнейшего исследования роли NSD1 в патогенезе ПРГШ и разработке новых терапевтических подходов, нацеленных на этот белок.

Материалы и методы. Для анализа белковой экспрессии белков в образцах, полученных от пациентов, использовали метод иммуногистохимии (ИГХ). Для краткосрочного снижения экспрессии NSD1 в клеточных линиях ПРГШ использовали нокдаун кшРНК NSD1, для долгосрочных – нокаут гена NSD1 с использованием системы CRISPR/Cas9. Для определения влияния истощения NSD1 на сигнальные клеточные пути использовали РНК-секвенирование и анализ обратной фазы белковой матрицы (RPPA) с последующей валидацией методами ПЦР и Вестерн-блот. ChIP-qPCR использовали для идентификации механизма регуляции нижестоящих мишеней белка NSD1. Исследование аутофагической деградиционной активности в клетках ПРГШ после истощения NSD1 осуществлялось с использованием конфокальной микроскопии.

Результаты. Анализ опухолевых тканей ПРГШ, полученных от ВПЧ-отрицательных пациентов, с использованием тканевых микрочипов (ТМА) показал, что экспрессия белков NSD1 и H3K36me2 была значительно выше в опухолевых тканях ПРГШ (стадии II–IV) по сравнению с нормальными эпителиальными тканями. Снижение роста клеток после истощения NSD1 было продемонстрировано как в краткосрочных экспериментах с использованием нокдауна кшРНК NSD1, так и в долгосрочных экспериментах с использованием CRISPR/Cas9 нокаута гена NSD1. Анализ обратной фазы белковой матрицы (RPPA) и последующая валидация выявили, что NSD1 способствует активации сигнального пути Akt/mTORC1. Кроме того, РНК-секвенирование продемонстрировало, что истощение NSD1 при ПРГШ вызывает активацию генных программ, связанных с аутофагией. Валидация продемонстрировала накопление белков p62 и LC3B-II и снижение аутофагического сигнального белка ULK1 как на уровне белка, так и на уровне мРНК. Интересно, что регуляция ULK1 посредством NSD1 была идентифицирована как H3K36me2-зависимый механизм. Исследование аутофагической деградиционной активности в клетках ПРГШ после истощения NSD1 выявило нарушение потока аутофагии.

Заключение. В настоящем исследовании было продемонстрировано, что NSD1 регулирует уровни H3K36me2 в ПРГШ, а истощение NSD1 приводит к снижению роста клеток ПРГШ как *in vitro*, так и *in vivo*. Также данное исследование выявляет положительную регуляцию аутофагии и сигнального пути Akt/mTORC1 как раннее не описанные функции NSD1 при ПРГШ. Данные, полученные в ходе исследования, способствуют более глубокому пониманию молекулярного ландшафта ПРГШ, подчеркивая терапевтический потенциал NSD1 как мишени для лечения этого типа рака.

Ключевые слова: гистон-метилтрансфераза NSD1, плоскоклеточный рак головы и шеи, аутофагия.

УДК: 547.853+577.2

Влияние лиганда адренорецепторов ницерголина на содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в клетках органов мышей

А.М. Шаурбина, К.Г. Геращенко, М.Я. Ибрагимова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Лекарственные препараты с рецепторным механизмом действия являются важным объектом исследования специалистов разных областей биологии, медицины, фармакологии и ветеринарии. Поскольку они имеют широкое применение для лечения большого спектра заболеваний, то комплексные, биохимические работы представляют научный интерес.

Ницерголин является малоизученным лекарственным препаратом, который применяют для лечения ухудшений мозгового кровообращения.

Целью данной работы явилось исследование влияния лекарственного препарата, блокатора альфа-адренорецепторов ницерголина на содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в органах мышей.

Результаты. Показано, что ницерголин не изменяет содержание диеновых конъюгатов в головном мозге, сердце, почке, печени и лёгких мышей, но есть достоверные различия в почке и лёгких. Выявлено, что ницерголин в дозах 2,72 и 5,44 мг/кг уменьшает содержание малонового диальдегида в головном мозге, в группах самок и самцов есть достоверные различия в почке и печени. Установлено, что ницерголин не изменяет активность каталазы в эритроцитах крови общей группы, в печени и лёгких самок мышей.

Ключевые слова: малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты, ницерголин, блокаторы альфа-адренорецепторов

Секция 4
«Молекулярные механизмы наследственных заболеваний»

УДК: 574.24:57.044:616.72-002.77

**Свинец как индивидуальный фактор риска повышенного уровня
ревматоидного фактора у лиц с наследственной предрасположенностью
к ревматоидному артриту**

С.В. Петров

E-mail: Sergeipetrov96@yandex.ru

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Определение причинно-следственных связей воздействия факторов окружающей среды на здоровье и жизнедеятельность человека необходимы для заблаговременного предупреждения и профилактики многих заболеваний [1]. Люди с нарушением иммунной системы являются наиболее уязвимой группой к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, что связано с повышенной чувствительностью иммунной системы. Длительное воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды может привести к хроническим иммуновоспалительным реакциям. Тяжелые металлы играют важную роль в развитии аутоиммунных патологий [2]. Они способны вызывать нарушения в функционировании различных систем организма и системы детоксикации, в частности. Цель исследования заключается в оценке связи между содержанием свинца в организме и уровнем ревматоидного фактора в крови лиц с наследственной предрасположенностью к ревматоидному артриту.

Материалы и методы. В работе проанализирован уровень ревматоидного фактора (РФ). Отбор проб биосубстратов (волос) и сбор информации об уровне РФ в крови проводился на основании данных амбулаторных карт во время ревматологического приема в центральных районных больницах 45 административных районов Республики Татарстан (РТ). Все участники подписали информированное согласие. Исследование включало в себя анализ показателей 81 лица на ранней стадии развития ревматоидного артрита. Отбор проб биосубстратов осуществлялся согласно методическим указаниям Федерального центра Госсанэпиднадзора Минздрава России [3]. Для выявления связи между содержанием свинца в волосах и уровнем РФ в крови был проведен корреляционный анализ с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена ($p < 0.05$). Сравнение полученных результатов происходило с установленными референтными значениями концентраций химических элементов в волосах человека [4]. Для оценки связи между факторами риска и показателями иммунного статуса проведен анализ отношения шансов (ОШ). Для оценки точности использовался 95% доверительный интервал, не перекрывающий нулевое значение. Для оценки рисков были построены таблицы сопряженности, с помощью которых сравнивали воздействие тяжелых металлов на иммунологические показатели крови.

Воздействие фактора риска оценивали с помощью добавочной вероятностью патологии δP . Для интерпретации силы связи между тяжелыми металлами и биомедицинскими показателями крови использовали критерий ϕ .

Результаты. На основании проведенных исследований установлено, что содержание свинца в волосах жителей РТ составляет от 0,1 до 8,6 мг/кг. Уровень РФ в крови исследуемых лиц находился в пределах 2,64–512 МЕ/мл, на патологические процессы указывает уровень выше 14 МЕ/мл. Выявлена прямая положительная корреляционная связь между содержанием свинца в волосах и уровнем РФ в крови ($r = 0.30$, $p = 0.008$). Для анализа воздействия факторов окружающей среды и особенностей системы детоксикации тяжелых металлов на выраженность специфических показателей иммунного статуса у лиц, с нарушением иммунной системы, был проведен корреляционный анализ между содержанием свинца в волосах и показателями РФ в крови исследуемых лиц. Оценка предполагаемой причинно-следственной связи указывает на то, что между фактором риска и исходом развития патологии в виде высокого уровня РФ для лиц на ранней стадии развития РА, является свинец ($OR = 10,69$ CI [1,64: 118,3], $p = 0,01$). Оценка силы связи между обнаруженным фактором риска и исходом для лиц на ранней стадии развития РА показала среднюю силу связи ($Pb\delta P = 0,41$; $\phi = 0,29$). У лиц на ранней стадии развития РА с повышенным уровнем свинца в волосах, наблюдаются более высокие показатели РФ, что может быть связано со снижением количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов, иммунных комплексов и увеличение концентрации В-лимфоцитов, иммуноглобулинов (IgM, IgG, IgA). Сравнительный анализ выявил статистически значимое различие уровня РФ в крови исследуемых лиц с содержанием свинца в волосах выше 1,4 мг/кг ($U = 563,5$; $Z = 2,77$; $p = 0,006$).

Заключение. Выявлены взаимосвязи между особенностями системы детоксикации свинца на выраженность иммунологических показателей (на примере ревматоидного фактора) в крови лиц с наследственной предрасположенностью к ревматоидному артриту. Установлено, что повышенные уровни свинца в волосах может являться индивидуальным фактором риска, связанным с выраженностью ревматоидного фактора в крови лиц на ранней стадии развития РА.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, ревматоидный фактор, тяжелые металлы, свинец, детоксикация.

1. Зайцева Н.В., Жданова-Заплесвичко И.Г., Землянова М.А., Пережогин А.Н., Савиных Д.Ф. Опыт организации и проведения санитарно-эпидемиологических исследований по выявлению и доказательству связи нарушений здоровья населения с качеством атмосферного воздуха в зонах влияния хозяйствующих субъектов // Здоровье населения и среда обитания – ЗНиСО. – 2021. – №1. – С.4–15.
2. Hybenova M., Hrda P., Procházková J., Stejskal V., Sterzl I. The role of environmental factors in autoimmune thyroiditis // Neuro Endocrinology Letters. – 2010. – Vol. 31. – P. 283–289.
3. Методика определения микроэлементов в диагностируемых биосубстратах методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС). Методические рекомендации. – Москва: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003. – 22 с.
4. Скальный А.В. Референтные значения концентраций химических элементов в волосах, полученные методом ИСП-АЭС // Микроэлементы в медицине. – 2003. – № 4(1). – С. 55–56.

Секция 5 «Биоинформатика»

УДК: 51-76

Анализ сетей взаимодействия гена *SLC34A2* и генов, отвечающих за гликозилирование белков человека, в нормальных и опухолевых тканях яичника

Р.А. Власенкова, К.И. Филюшина, Р.Г. Киямова

E-mail: r.mukhamadeeva@yandex.ru

Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. NaPi2b – это натрий-зависимый фосфатный транспортер, который кодируется геном *SLC34A2*. Повышенная экспрессия NaPi2b обнаружена в опухолях различной локализации, включая рак яичника [1, 2]. Мы предполагаем, что в условиях опухолевого микроокружения клеток происходят аномальные посттрансляционные модификации, включая N-гликозилирование, в большом внеклеточном домене (ВКД) NaPi2b, которые приводят к изменению его конформации. При этом может становиться доступным потенциальный опухольспецифический эпитоп MX35, который распознается соответствующими антителами [3, 4]. Анализ взаимодействия NaPi2b с белками, ответственными за гликозилирование, может помочь в идентификации маркеров аномального гликозилирования. Для этого можно использовать метод анализа взвешенных сетей взаимодействия генов.

Цель нашего исследования – анализ взаимодействия NaPi2b с генами, ответственными за гликозилирование, для обнаружения маркеров аномального гликозилирования в ВКД NaPi2b в нормальных и опухолевых клетках.

Материалы и методы. Для анализа нами были отобраны 214 генов гликозилтрансфераз и сульфотрансфераз человека, а также ген *SLC34A2*. Данные об экспрессии отобранных генов в опухолевых (n=539) и нормальных (n=40) образцах тканей яичника были получены из исследования E-MTAB-3732 базы данных ArrayExpress [5]. Данные о взаимодействиях отобранных генов были собраны из баз данных Gene Ontology, String, KEGG, Reactome, WikiPathways, InterPro и Pfam (7025 взаимодействий). Нами были получены статистически значимые коэффициенты ко-экспрессии генов (корреляция Спирмана, $p < 0.05$). На основе коэффициентов корреляции и данных о взаимодействиях генов были построены взвешенные сети взаимодействия генов. Взвешенные сети взаимодействия генов, построенных по данным опухолевых и нормальных образцов тканей яичника, были сравнены с помощью метода кофенетической корреляции. По построенным сетям были определены центральные гены и модули генов.

Результаты. Значение кофенетической корреляции взвешенных сети взаимодействия генов *SLC34A2*, гликозилтрансфераз и сульфотрансфераз человека по

данным опухолевых и нормальных образцах тканей яичника составило 0,17, что указывает на значимые различия между сетями. В сети взаимодействия генов нормальных тканей яичника определены 19 ключевых генов: *CSGALNACT2*, *DPM1*, *DSE*, *EXT1*, *EXT2*, *EXTL3*, *FKRP*, *GALNT2*, *GALNT8*, *GLCE*, *MGAT3*, *MGAT4B*, *MGAT4C*, *NDST4*, *PIGA*, *POMT2*, *ST3GAL2*, *ST8SIA4*, *UGGT2*. В сети взаимодействия генов опухолевых образцов яичника выявлено 15 ключевых генов: *B4GNT*, *B3GALT5*, *B3GAT1*, *B3GNT2*, *CHPF2*, *FUT1*, *FUT2*, *GALNT12*, *GCNT1*, *GCNT2*, *PGAP4*, *PIGB*, *ST3GAL1*, *ST3GAL6*, *ST6GAL1*. В обеих сетях взаимодействия генов определены 2 ключевых гена: *C1GALT1* и *B3GALT2*. При определении модулей сетей взаимодействия генов было обнаружено, что ген *SLC34A2* найден только в группе сети взаимодействия генов опухолевых тканей яичника. При анализе взвешенных сетей взаимодействия генов мы обнаружили гены, которые являются ключевыми в сети взаимодействия опухолевых тканей яичника и входят в крупнейший модуль вместе с геном *SLC34A2*: *B3GNT2*, *GCNT1*, *ST3GAL1*, *ST6GAL1*.

Заключение. Результаты исследования позволяют предположить, что различия в экспрессии генов *ST6GAL1*, *B3GNT2*, *GCNT1* и *ST3GAL1* в опухолевых и нормальных тканях яичника могут быть связаны с аномальным гликозилированием белка NaPi2b во внутриклеточном пространстве (ВКД) опухолевых клеток. Взаимодействие данных генов с *SLC34A2* ранее не было описано в литературе, а гены *B3GNT2*, *GCNT1* и *ST3GAL1* ранее не были изучены в контексте рака яичника. Безусловно, требуются дальнейшие исследования данных генов и их продуктов в связи с белком NaPi2b. Выяснение изменений в паттернах совместной экспрессии генов в опухолевых и нормальных тканях яичника не только расширяет наше понимание механизма изменения конформации ВКД NaPi2b в опухолевых клетках, но и предоставляет ценную информацию для разработки противоопухолевых лекарств.

Ключевые слова: NaPi2b, опухоль-специфический эпитоп, гены гликозилтрансфераз и сульфотрансфераз, взвешенные сети взаимодействия генов, яичник.

Работа выполнена при инфраструктурной поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

1. Vlasenkova, R., Nurgalieva, A., Akberova, N., Bogdanov, M., & Kiyamova, R. Characterization of *SLC34A2* as a potential prognostic marker of oncological diseases // *Biomolecules*. – 2021. – V. 11. – № 12. – P. 1878.
2. Kiyamova, R.; Shyian, M.; Lyzogubov et al. Immunohistochemical Analysis of NaPi2b Protein (MX35 Antigen) Expression and subcellular Localization in Human Normal and Cancer Tissues. *Exp. Oncol.* 2011, 33, 157–161. Yin B.W.T., Kiyamova R., Chua R. Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (*SLC34A2*) in human carcinomas // *Cancer immunity*. – 2008. – V. 8. – № 1.
3. Kiyamova R., Gryshkova, V., Ovcharenko, G. et al. Development of monoclonal antibodies specific for the human sodium-dependent phosphate co-transporter NaPi2b // *Hybridoma*. – 2008. – T. 27. – № 4. – P. 277 – 284.

4. Bulatova L., Savenkova D., Nurgalieva A. et al. Toward a Topology-Based Therapeutic Design of Membrane Proteins: Validation of NaPi2b Topology in Live Ovarian Cancer Cells // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2022 – V. 9 – P. 895911.
5. Torrente, A.; Lukk, M.; Xue, V.; Parkinson, H.; Rung, J.; Brazma, A. Identification of Cancer Related Genes Using a Comprehensive Map of Human Gene Expression. // *PLoS ONE*. –2016– V. 11–e0157484.

УДК: 557.152.314:57.042.2

Оценка ингибирующей активности белка YrdF *Bacillus pumilus* в отношении рибонуклеаз патогенных микроорганизмов *in silico*

А.С. Коснырев, С.А. Лугинская, В.В. Ульянова

E-mail: s_kosnyrev@mail.ru

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Ингибиторы бактериальных рибонуклеаз (РНКаЗ) сыскали большой научный интерес среди исследователей, поскольку эти белки являются природными регуляторами активности ферментов. На сегодняшний день предложено использование рибонуклеазных ингибиторов в качестве антибактериальных агентов [1]. Показано, что ряд низкомолекулярных соединений с ингибиторной активностью в отношении рибонуклеаз снижает жизнеспособность микробных клеток. Подобные соединения описаны для РНКаЗы P *Staphylococcus aureus*, РНКаЗы E и G *Escherichia coli* и аналогичных рибонуклеаз у *Mycobacterium tuberculosis* [2, 3]. В связи с этим было выдвинуто предположение о возможном противомикробном эффекте предполагаемого ингибитора секретируемых РНКаЗ *Bacillus pumilus* – белка YrdF. Так, целью данного исследования стала первичная оценка ингибиторного потенциала YrdF в отношении рибонуклеаз патогенных микроорганизмов.

Материалы и методы. Для работы в базе данных UniProt были выбраны следующие белки: РНКазаЕ *E. coli* (P21513), РНКаза Н *Salmonellaparatyphi* (Q5PFD8) и РНКаза 3 *S. enteritidis* (B5QTU8), РНКаза 3 *Listeriamonocytogenes* (Q8Y691). Их третичные структуры и структура ингибитора YrdF были предсказаны и смоделированы с помощью ИИ-модели AlphaFold 3, а затем были отобраны наиболее качественные третичные структуры по показателю достоверности для каждого аминокислотного остатка и прогнозируемой оценке шаблонного моделирования. Полученные модели были использованы для *ab initio* предсказания структуры гетеродимеров ингибитора YrdF и каждой из исследуемых РНКаЗ, а также гетеродимера ингибитора и его предполагаемого нативного партнера – РНКаЗы бионазы *B. pumilus*. Моделирование стыковки проводили с помощью инструмента GalaxyHeteromer. Оценивали общее качество стыковки, а также связывание рибонуклеазного ингибитора с активными центрами исследуемых ферментов. Модели анализировали в молекулярном редакторе SwissPDBViewer 4.1.0.

Результаты. Анализ полученных гетеродимеров ингибитора и РНКаЗ показал, что YrdF образует контактную поверхность с РНК-связывающим мотивом S1 РНКаЗы *E. coli*, также закрывая каталитическую петлю в положении 404-407, показатель стыковки составил 1258. В случае РНКаЗы Н *S. paratyphi* ингибитор

лишь частично закрывал полость с активным центром, показатель стыковки был равен 896. YrdF взаимодействовал с РНКазой 3 *S. enteritidis* как в каталитическом кармане, полностью закрывая его, так и частично с доменом, связывающим двухцепочечную РНК (DSRM), а показатель стыковки был равен 927. Для РНКазы 3 *L. monocytogenes* контактная поверхность была аналогична предыдущему белку за исключением области, затрагивающей DSRM, а показатель стыковки составил 820. При этом показатель стыковки YrdF и его нативного фермента-партнёра бионазы составил лишь 814, но контактная поверхность имела большую площадь по сравнению с другими исследуемыми белками.

Заключение. Полученные путём моделирования комплексы ингибитора секретируемых рибонуклеаз YrdF *B. pumilus* и некоторых РНКаз патогенных микроорганизмов свидетельствуют о потенциальной ингибиторной активности YrdF по отношению к данным ферментам. Дальнейшие исследования позволят подтвердить полученные результаты экспериментально и оценить их вклад в возможное противомикробное действие ингибитора рибонуклеаз.

Ключевые слова: рибонуклеазы, ингибиторы, патогенные микроорганизмы, ИИ-модели.

1. Matos R.G., Simmons K.J., Fishwick C.W.G., McDowall K.J., Arraiano C.M. Identification of Ribonuclease Inhibitors for the Control of Pathogenic Bacteria // Int J Mol Sci. – 2024. – V. 25. – №15. – P. 8048.
2. Olson P.D., Kuechenmeister L.J., Anderson K.L., Daily S., Beenken K.E., Roux C.M., Reniere M.L., Lewis T.L., Weiss W.J., Pulse M. Small molecule inhibitors of Staphylococcus aureus RnpA alter cellular mRNA turnover, exhibit antimicrobial activity, and attenuate pathogenesis // PLoS Pathog. – 2011. – V.7. – e1001287.
3. Kime L., Vincent H.A., Gendoo D.M., Jourdan S.S., Fishwick C.W., Callaghan A.J., McDowall K.J. The first small-molecule inhibitors of members of the ribonuclease E family // Sci. Rep. – 2015. – V. 5. – P. 8028.

УДК:575.167

Биоинформатическое моделирование как инструмент в оптимизации индивидуальных профилактических программ по предотвращению миопии у детей

В.Р. Халилов

E-mail: shironoir@yandex.ru.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. В условиях быстрого роста заболеваемости миопией среди детей возрастает необходимость в методах профилактики, которые учитывают не только клинические, но и поведенческие, генетические и экологические факторы. Для этого нужна система, способная собирать и анализировать разнообразные данные для построения точных прогнозов и оценки эффективности профилактических мер. Биоинформатическая модель может интегрировать данные из разных источников, таких как

образ жизни, наследственные факторы и медицинские записи, формируя целостное представление о состоянии здоровья и уровне риска для каждого пациента.

Материалы и методы. Разработка биоинформатической модели предполагает использование данных о генетической предрасположенности к миопии (однонуклеотидные полиморфизмы), поведенческих факторов (время, проведенное на свежем воздухе, и зрительные нагрузки) и офтальмологических данных (рефракционные показатели, история заболеваний). Сбор поведенческих данных будет проводиться через мобильные приложения и носимые устройства, предоставляющие ежедневные данные о зрительном режиме. Платформа позволит создавать персонализированные профилактические рекомендации на основе индивидуальных факторов риска, что повысит эффективность профилактики миопии у детей.

Результаты. В результате биоинформатического моделирования удастся выявить ключевые генетические и поведенческие предикторы прогрессирования миопии у детей. Разработанные модели с использованием машинного обучения и регрессионного анализа показывают высокую точность в прогнозировании риска миопии. Индивидуальные профилактические программы, сформированные на основе рекомендаций платформы, демонстрируют значительное замедление прогрессирования миопии у участников исследования, придерживавшихся рекомендаций.

Заключение. Создание биоинформатической платформы для мониторинга и оценки профилактических мер против миопии у детей является важным шагом к повышению эффективности профилактики этого заболевания. Использование передовых биоинформатических технологий обеспечит врачей точными данными для принятия более обоснованных решений, а также усилит контроль над прогрессированием заболевания. Внедрение этой платформы в медицинскую практику может существенно снизить распространенность миопии среди детей и улучшить качество их жизни.

Ключевые слова: детская миопия, биоинформатическая платформа, мониторинг, профилактика.

Секция 6
«Биотехнология и бионанотехнология»

УДК: 579.64:632.937

**Бактериальные штаммы *Pantoea brenneri* в качестве биопрепаратов
для защиты растений**

Д.С. Бульмакова, Л.В. Сокольникова, А.Д. Сулейманова

E-mail: daria_bulmakova@mail.ru.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Вопросы экологической безопасности стоят перед человечеством во всех сферах деятельности. Современное агропроизводство все чаще сталкивается с необходимостью решения таких проблем, как поиск эффективных средств защиты сельскохозяйственных культур от болезней, вредителей и сорняков с одновременным снижением техногенной нагрузки на окружающую среду. Биотехнологии на основе штаммов микроорганизмов позволяют разработать альтернативную стратегию экологически устойчивого и стабильного землепользования, основанную на замене применяемых химических препаратов микробными биопрепаратами. Объектом исследований явились выделенные ранее почвенные изоляты *Pantoea brenneri*, для которых показаны множественные положительные эффекты на рост и жизнедеятельность растений [1]. Нами установлена антагонистическая активность штаммов *P. brenneri* в отношении широкого спектра фитопатогенных микроорганизмов. Установлено, что штаммы характеризуются фунгицидной активностью в отношении микромицетов *Fusarium sambucinum*, *F. solani* и *Colletotrichum coccodes*, и фунгистатической активностью в отношении *F. oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp. и *Ascochyta kamchatica*. Штаммы *P. brenneri* обладали антибактериальной активностью в отношении фитопатогена *Erwinia amylovora*, вызывающей бактериальный ожог растений семейства розоцветных, среди которых плодовые культуры – яблоня, груша, айва, мушмула и другие [2]. Целью данной работы явилась оценка стабильности и выживаемости штаммов *P. brenneri* на листьях яблони и груши.

Материалы и методы. Оценку выживаемости штаммов *P. Brenneri* проводили на листьях яблони и груши по методу [3]. Листья, обработанные бактериальной суспензией, отбирали в начале (0 сут) и конце (7 сут) эксперимента, подсчитывали число клеток. Для этого отдельный лист замачивали в 5 мл физиологического раствора и инкубировали в течение 30 мин с перемешиванием. Готовили серию разведений полученного раствора с клетками с последующим их высевом на твердую питательную среду ЛАВ чашки Петри и подсчетом числа колониеобразующих единиц (КОЕ).

Результаты. Подсчет числа КОЕ для штаммов *P. brenneri* на листьях яблони и груши проводили в начале эксперимента и по истечению 7 суток. Показано, что

штаммы сохраняли жизнеспособность в течение всего эксперимента. При этом, количество клеток уменьшалось незначительно. Существенной разницы в результатах с использованием листьев яблони и груши не наблюдали. На начало эксперимента число бактериальных клеток на лист составляло в среднем $(1.7-1.8) \times 10^5$ КОЕ, к концу эксперимента – около $(1.1-1.3) \times 10^5$ КОЕ.

Заключение. Суммируя результаты данной работы и проведенных ранее исследований, можно сделать вывод, что по основным характеристикам штаммы *P. brenneri* обладают высоким практическим потенциалом и могут служить основой для разработки экологически безопасных биопрепаратов.

Ключевые слова: *Pantoea brenneri*, микробный биопрепарат.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 23-76-01078.

1. Иткина Д.Л., Сулейманова А.Д., Шарипова М.Р. *Pantoea brenneri* AS3 и *Bacillus ginsengihumi* M2.11 как потенциальные агенты биоконтроля и стимуляторы роста растений // Микробиология. – 2021. – Т. 90. – С. 204 – 214.
2. Бульмакова Д.С., Шагиева Г.И., Иткина Д.Л., Ленина О.А., Шарипова М.Р., Сулейманова А.Д. Антагонистические штаммы *Pantoea brenneri* как средства защиты растений // Микология и фитопатология. – 2023. – Т. 57. – № 5. – С. 352– 361.
3. Dagher F., Olishevskaya S., Philion V., Zheng J., Deziel E. Development of a novel biological control agent targeting the phytopathogen *Erwinia amylovora* // Heliyon. – 2020. – V. 6 (10). – P.e05222.

УДК: 576

Получение и характеристика микровезикул из индуцированных Т-регуляторных клеток

И.А. Ганеев, Е.А. Змиевская, Э.Р. Булатов

E-mail: kovirka1995@gmail.com

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г.Казань, 420008, Россия

Введение. Рассеянный склероз (РС) – это хроническое аутоиммунное воспалительное заболевание центральной нервной системы, характеризующееся разрушением миелина и нарушением гематоэнцефалического барьера, что приводит к дегенерации аксонов и воспалению. РС представляет собой клеточно-опосредованное аутоиммунное заболевание, направленное против миелиновых антигенов центральной нервной системы, включающее в патогенез как $CD4^+$, так и $CD8^+$ Т-клеток. Общепризнанной является роль $CD4^+CD25^{hi}$ регуляторных Т-клеток в патогенезе РС, выраженная в частичной утрате их нормальной иммуносупрессивной функции. В то же время у пациентов с РС наблюдается утрата этой иммуносупрессивной функции Тreg-клеток, что связывают с нарушением работы внеклеточных везикул, содержащих ключевые белки и РНК для регуляции выживаемости и пролиферации Т-лимфоцитов. Цель исследования – изучить особенности микровезикул, выделенных из индуцированных Тreg-клеток, полученных из периферической крови, и охарактеризовать их состав в зависимости от метода индукции. Это позволит глубже понять их функциональные свойства и возможности использования для восстановления супрессорной активности у пациентов с РС.

Материалы и методы. Из моноклеарных клеток периферической крови здорового донора выделяли CD4⁺ наивные Т-клетки методом магнитной сепарации, затем активировали жидким анти-CD3/CD28 активатором и дифференцировали в индуцированные Т-регуляторные клетки в присутствии ИЛ-2 и TGF- β . Из полученных клеток выделяли естественные микровезикулы, микровезикулы, индуцированные цитохалазином В и микровезикулы, индуцированные ультразвуком. Для характеристики микровезикул использовали сканирующую электронную микроскопию, анализ размера и траектории наночастиц, проточную цитофлуориметрию и вестерн-блот анализ.

Результаты. Во всех трех препаратах методом сканирующей электронной микроскопии были визуализированы шаровидные мембранные структуры (везикулы) различного размера. При этом в образце, полученном ультразвуковой индукцией, в сравнении с естественными везикулами и везикулами, полученными путем стимуляции цитохалазином В, были визуализированы в большом количестве мелкие везикулы ($d \sim 10$ нм), довольно густо расположенные по всему полю визуализации. Средний размер частиц варьировал в зависимости от метода: для естественных микровезикул он составил $205 \pm 3,1$ нм, для индуцированных цитохалазином В – $175 \pm 3,9$ нм, а для ультразвуковых – $207 \pm 5,6$ нм. При этом наибольший выход везикул на одну клетку составил 178,14 шт./кл. в образце, полученном методом ультразвуковой индукции. Проточной цитометрией было подтверждено наличие основных супрессорных мембранных белков (PD-1, CTLA-4, Lag-3, Tim-3) во всех трех образцах микровезикул, что может свидетельствовать о их регуляторной функции. Вестерн-блот анализ показал повышенное содержание элементов эндоплазматического ретикула (ЭПР) в образце, полученном методом ультразвуковой индукции, по сравнению с другими образцами, что может быть связано с особенностями метода получения. Также, методом вестерн-блот анализа было показано отсутствие Casp3 во всех трех исследованных образцах, что исключает возможную апоптотическую природу происхождения микровезикул.

Заключение. В ходе работы несколькими методами были успешно получены и охарактеризованы микровезикулы из индуцированных Т-регуляторных клеток с подтвержденным регуляторным фенотипом, а также подтвержден перенос важных иммуносупрессорных молекул из исходных клеток в везикулы. Установлены отличия в размере, выходе и составе микровезикул, полученных различными методами индукции, что подчеркивает влияние метода на свойства везикул. Результаты исследования указывают на значительный потенциал использования микровезикул, полученных методом ультразвуковой индукции, для восстановления супрессорной активности у пациентов с РС. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение механизмов передачи иммуносупрессорных сигналов, что может открыть перспективы для новых терапевтических подходов в лечении рассеянного склероза.

Ключевые слова: микровезикулы, цитохалазин В, ультразвук, супрессорные мембранные белки, рассеянный склероз.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 23-24-00224.

Механизмы снижения послеуборочных болезней *Solanum tuberosum* L. эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* в композиции с салициловой кислотой: роль вторичных метаболитов с антимикробной активностью

Д.Ю. Гаршина^{1,2}, Л.И. Пусенкова¹, О.В. Ласточкина²

E-mail: dariya.greatfire@mail.ru

¹Башкирский НИИСХ УФИЦ РАН, г. Уфа, Россия

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа, Россия

Введение. Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является основной продовольственной культурой во всем мире благодаря своей питательной ценности и полезным свойствам. Послеуборочные болезни приводят к значительным продовольственным и экономическим потерям. Экологичные и биобезопасные подходы играют важную роль в борьбе с послеуборочными заболеваниями клубней [1].

Материалы и методы. Ранее мы продемонстрировали, что эндофитные бактерии *Bacillus subtilis* (штаммы 10-4, 26Д) и их композиции с природной сигнальной молекулой салициловой кислотой (СК) снижают (до 30-50%) частоту возникновения на хранящемся картофеле сухой гнили и фитофтороза, вызываемых *F. oxysporum* и *Ph. infestans*, соответственно [2]. Причем максимальный пролонгированный защитный эффект достигался при применении композиции *B. subtilis* 10-4+СК. В данной работе проведен анализ полного генома *B. subtilis* 10-4 для выявления кластеров генов, ответственных за синтез вторичных метаболитов с антимикробной активностью, а также оценена *in vitro* способность 10-4 синтезировать липопептиды (ЛП), СК и подавлять рост *F. oxysporum* и *Ph. infestans*.

Результаты. Обнаружено, что геном штамма 10-4 содержит кластеры генов, ответственные за синтез таких вторичных метаболитов с антимикробной активностью как поликетиды типа III, нерибосомные пептид-синтетазы, беталактоны, сактипептиды, рантипептиды, нерибосомные пептидные металлофоны, трансАТ-ПКС и терпены. С помощью программы anti-SMASH bacterial предсказано, что антагонистическая активность штамма 10-4 связана с образованием семейства липопептидов сурфактина, фенгицина, бациллена, субтилозина А и бациллобактина. При анализе генома штамма 10-4, также были выявлены гены (*srfAA*, *srfAB*, *srfAC*, *srfAD*), кодирующие субъединицы сурфактин-синтазы 1, 2, 3. Методами масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии показано наличие в культуральной жидкости штамма 10-4 трех изоформ сурфактина (C13-C15) (с наибольшим относительным содержанием изоформ C13 и C15) и СК.

In vitro тесты показали, что изолированные липопептиды штамма 10-4 сдерживали рост *F. oxysporum* и *Ph. infestans*, а также приводили к нарушениям структуры клеточных мембран патогенов.

Заключение. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что продуцируемые штаммом 10-4 выявленные вторичные метаболиты являются важным механизмом индукции устойчивости клубней картофеля

к сухой гнили и фитофторозу при длительном хранении, а также сохранению их качества и товарного внешнего вида.

Ключевые слова: послеуборочные болезни, *Bacillus subtilis*, салициловая кислота, полногеномный анализ, антимикробная активность.

1. Пусенкова Л.И., Гарипова С.Р., Федорова К.А., Дедова М.А. Влияние кратности обработок картофеля эндофитными бактериями *bacillus subtilis* на содержание пигментов в листьях, продуктивность и устойчивость к болезням // Достижения науки и техники АПК. – 2022. – № 10. – С. 11 – 17.

2. Пусенкова Л.И., Гарипова С.Р., Ласточкина О.В., Шпирная И.А., Валиева В.А. Влияние эндофитных бактерий *bacillus subtilis* на активность метаболических процессов, протекающих в клубнях картофеля при хранении // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2023. – № 4. – С. 569 – 578.

УДК: 578.226

Сравнение эффективности трансдукции клеточных культур человека аденоассоциированными вирусами разных серотипов

**А.А. Губайдуллина¹, Б.Р. Каюмова¹, Т.С. Царегородцева¹, А.А. Шаршакова^{1,2},
А.А. Шаймарданова^{1,2}**

E-mail: gubajdullina.a.a@gmail.com

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань,
420008, Россия

²НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии, г. Казань, 420021, Россия

Введение. Генная терапия – революционный подход к лечению заболеваний путем введения генетического материала в клетки пациента для коррекции дефектов или обеспечения терапевтического эффекта. Аденоассоциированные вирусы (ААВ) являются привлекательными векторами для генной терапии из-за высокой эффективности трансдукции, отсутствия патогенности и способности интегрироваться в геном хозяина без нарушения функции генов [1]. Известно порядка двенадцати различных серотипов ААВ человека, каждый из которых имеет. Эффективность трансдукции может значительно варьироваться в уникальную капсидную структуру и определенные преимущества зависимости от используемого серотипа ААВ [2]. Для оптимизации выбора вектора для конкретных клеток-мишеней необходимо изучение и сравнение эффективности трансдукции различных серотипов ААВ [3]. На основании всех этих данных была поставлена цель: получение вирусных векторов на основе плазмид, модификация ими клеточных линий HEK293 и SH-SY5Y и дальнейшее сравнение эффективности трансдукции различных серотипов ААВ. Полученные результаты позволят судить о наиболее оптимальном типе серотипа ААВ.

Материалы и методы. Для сборки рекомбинантных ААВ использовали плазмиды pAAV-RC2, pAAV-RC9, pAAV-RC10, pAAV-RCOlig001 (Agilent Technologies, США) и pHelper (Agilent Technologies, США), pAAV-GFP. Трансфекцию проводили с использованием полиэтиленимина (Кат. № 408727, Sigma-

Aldrich, США). Клетки для этого культивировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂, дальнейший подсчет клеток проводили в камере Горяева. По прошествии 2 суток с трансфекции проанализировали уровень экспрессии репортерного трансгена методом флуоресцентной микроскопии.

Результаты. Успешная трансдукция сконструированными AAV культуры клеток HEK293 и SH-SY5Y продемонстрировала экспрессию гена GFP, что является показателем функциональности данной генетической кассеты. В случае клеток HEK293, серотип AAV2 обладал наивысшим показателем трансдукции из-за распространенности его корецепторов на разных клетках. Для клеток нейробластомы большую эффективность показал модифицированный серотип AAV Olig001, благодаря преимущественному тропизму к клеткам нервной системы.

Заключение. Полученные результаты отражают предпочтительный тропизм различных серотипов AAV. При этом наиболее эффективным, судя по показателям, является серотип AAV2, в особенности из-за его широкого спектра тропности. Это также объясняет его широкое использование при разработке лекарственных препаратов. Для более узко специализирующихся исследований эффективнее использование серотипов с модифицированными капсидами, так как это повышает уровень сродства и преимущественный тропизм, например, к клеткам нервной системы.

Ключевые слова: генная терапия, аденоассоциированный вирус, тропность, серотип.

1. Bijlani S. The Role of Recombinant AAV in Precise Genome Editing / S.Bijlani, K.M.Pang, V. Sivanandam, A. Singh, S. Chatterjee // Front Genome Ed. – 2022. – V. 3. – P. 799722.
2. Srivastava A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors / A. Srivastava // Curr Opin Virol. – 2016. – V. 21. – P. 75 – 80.
3. Riyad J.M. Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: challenges and future directions / J.M. Riyad, T. Weber // Gene Ther. – 2021. – V. 28. (12). – P. 683 – 696.

УДК: 576

Влияние искусственных везикул из CAR-Тклеток на клетки опухолевых линий РСЗМ и А431

Е.А. Змиевская, Э.Р. Булатов

E-mail: ekazmievskaia@gmail.com

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR-Т терапия) – одна из самых перспективных ветвей современной клеточной иммунотерапии. Будучи успешно применяемой в клинической практике для лечения онкогематологических CD19+ и BCMA+ опухолей, в лечении солидных новообразований CAR-Т терапия пока показывает существенно более скромные результаты. Для этого существует ряд объективных причин, среди которых можно выделить [1]:

1) ограничение миграции и инвазии Т-клеток в ткань солидных опухолей из-за сложного строения и повышенной плотности опухолевой стромы. В связи с чем

предпочтителен поиск клеточных и субклеточных агентов (например, внеклеточные везикулы (ВВ)), способных активнее проникать в плотную опухолевую строму в силу меньшего размера по сравнению с клетками;

2) иммуносупрессивное опухолевое микроокружение (ингибиторные рецепторы, нехватка нутриентов, иммуносупрессивные цитокины и клетки, локальная гипоксия, и т.д.). Данная проблема потенциально может быть решена применением (суб)клеточного агента, устойчивого к перечисленным факторам, например, внеклеточных везикул.

Применение внеклеточных везикул, в частности, например, экзосом, полученных из CAR-T-клеток, представляет большой научный интерес в качестве перспективного терапевтического подхода для лечения солидных новообразований [2]. Однако, несмотря на то что ряд разработок на основе ВВ достигли клинических исследований, основным препятствием к внедрению таких препаратов является отсутствие масштабируемой стандартизированной технологии производства. В связи с этим, с целью поиска метода получения ВВ с высоким и стабильным выходом исследуется множество способов индукции образования везикул – как естественных (пассивная секреция, активация клеток), так и стрессовых (голод, гипоксия, механическое воздействие, химические агенты, температурный шок). В то же время все проведенные на сегодняшний день исследования внеклеточных везикул, полученных из CAR-T-клеток, используют естественно секретированные или физиологически индуцированные микровезикулы или экзосомы, которые технологически сложно получить в достаточном для клинического применения количестве.

Таким образом, актуальной является задача разработки метода получения искусственных CAR-T-везикул с высоким выходом конечного продукта и достаточной функциональной активностью для потенциального применения в качестве противоопухолевого препарата.

Материалы и методы. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) получали из цельной крови здоровых доноров методом центрифугирования на фиколле с плотностью 1,077 г/мл (Панэко, Россия). Т-клетки избирательно активировали с помощью T-cell TransAct (Miltenyi, США) с добавлением IL-2 (Prospec, Израиль). Через 24–36 ч после активации первичные Т-клетки использовали для трансдукции лентивирусным вектором CAR. Для получения искусственных везикул (ИВ) клетки дважды промывали DPBS и ресуспендировали в бессывороточной среде и подвергали ультразвуковому воздействию с помощью гомогенизатора Qsonica Q125 (Qsonica, США) с частотой 20 кГц и амплитудой 255 мкм (при режиме 30% мощности), 1 с воздействия, 1 с паузы в течение суммарно 1 минуты на льду. Сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) проводили на микроскопе Merlin (Carl Zeiss, Германия). Полученные изображения использовали для измерения размеров частиц с помощью программы ImageJ. Методику проточной цитометрии везикул проводили согласно Pospichalova et al. [3]: для гейтирования популяции ВВ применяли двойное окрашивание – липидным красителем (например, DiO) и мечеными антителами к белковой молекуле (например, белком-антигеном к CAR). Анализ влияния искусственных везикул на пролиферацию клеток опухо-

левых линий проводили на приборе xCelligence (ACEA Biosciences, США). Культуры клеток РС3М, РС3М(CD19+), А431 и А431(CD19+) рассеивали в планшеты E-Plate 16 (ACEA Biosciences, США). Через 24 часа вносили в лунки исследуемые образцы везикул в концентрации 15 мкг/мл по данным измерения общего белка или Т- и CAR-Т-клетки в соотношении Е:Т=1:1 и продолжали регистрацию КИ. Регистрацию КИ проводили каждые 15 минут. Для исследования влияния искусственных CAR-везикул на экспрессию про-апоптотических генов в опухолевых клетках применяли ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. Количественную ПЦР проводили в объеме реакции 10 мкл с использованием смеси для ПЦР 5X qPCRmix-HS (Евроген) и специфических праймеров к TP53, CDKN1A(p21), MDM2, PUMA (BBC3) и BAX, синтезированных компанией Евроген. Реакцию амплификации проводили на приборе C1000 (Bio-Rad). Для обработки результатов применяли метод $\Delta\Delta C_t$, нормализацию проводили на пороговые значения цикла гена АСТВ. Расчеты проводили в ПО MS Excel (Microsoft).

Результаты. Методом проточной цитометрии было обнаружено, что в образцах везикул, полученных из CAR-Т-клеток, процент CAR-положительных везикул составляет $52,7 \pm 20,5\%$. По данным СЭМ преобладающей популяцией для CAR-ИВ являются частицы с диаметром 51-75 нм с довольно узким моодисперсным пиком, но в то же время встречаются и крупные частицы вплоть до 600 нм. Тогда как для немодифицированных Т-лимфоцитов большинство частиц лежит в диапазоне 75-200 нм, а частиц крупнее 450 нм не обнаружено. По данным биосенсорного клеточного анализа в режиме реального времени для линии РС3М не обнаружено значимого влияния искусственных везикул на величину клеточного индекса, в то время как у линии РС3М(CD19+) выявлено его снижение на 27% под действием CAR-ИВ и на 14% под действием Т-ИВ. Для линии А431 была обнаружена тенденция к снижению клеточного индекса под действием искусственных везикул. Для линии А431(CD19+) было показано снижение КИ на 55% под действием Т-ИВ и на 68% под действием CAR-ИВ. С помощью РВ-ПЦР с обратной транскрипцией продемонстрировано, что CAR-ИВ способны вызывать антиген-специфическое повышение уровня экспрессии про-апоптотических генов MDM2, p21(CDKN1A), BBC3(PUMA) в клетках опухолевых линий А431 и РС3М, экспрессирующих таргетный антиген CD19.

Заключение. Таким образом, было показано, что искусственные везикулы, полученные с помощью ультразвука из CAR-Т-клеток, экспонируют на поверхности CARи проявляют антиген-специфические цитостатические свойства.

Ключевые слова: CAR-Т терапия, везикулы, ультразвук, противоопухолевая активность.

1. Киселевский М. В., Чикилева И. О., Ситдикова С. М., Власенко Р. Я., Караулов А. В. Перспективы применения генетически модифицированных лимфоцитов с химерным Т-клеточным рецептором (CAR-Т-клеток) для терапии солидных опухолей // Иммунология. – 2019. – Т. 40. – С. 48 – 55.
2. Calvo V., Izquierdo M.T. Lymphocyte and CAR-T Cell-Derived Extracellular Vesicles and Their Applications in Cancer Therapy // Cells. – 2022. – V. 11. – P. 790.
3. Pospichalova V., Svoboda J., Dave Z., Kotrbova A., Kaiser K., Klemova D., Ilkovics L., Hampl A., Crha I., Jandakova E. Minar L., Weinberger V., Bryja V. Simplified protocol for flow cytometry

УДК:615.355:661.183.4

Иммобилизация лизоцима на поверхности каолина и монтмориллонита

И.Р. Ишмухаметов, Г.И. Фахруллина, Ю.В. Чередниченко

E-mail: irishmukhametov@gmail.com

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Каолин и монтмориллонит используются в фармацевтической промышленности при производстве лекарственных препаратов в качестве вспомогательного вещества или активного ингредиента. Данные глинистые минералы служат носителями для доставки лекарств, белков и генов [1], и являются основой нанокомпозитов, способствующих снижению токсичности, повышающих антимикробную активность и обеспечивающих термическую и механическую стабильность. Подобные нанокомпозиты находят применение при разработке антимикробных покрытий в пищевой промышленности, оптической и биомедицинской областях, а также при очистке сточных вод [2].

Материалы и методы. В работе были использованы каолин (Sigma-Aldrich, США), монтмориллонит (Sigma-Aldrich, Германия), лизоцим (Serva, Германия) и карбоксиметилцеллюлоза (Fluka, Швейцария). Для получения нанокомпозитов на основе наноглин к 1 мл водного раствора лизоцима в концентрации 50 мг/мл добавляли 10 мг каолина или монтмориллонита. После чего проводили обработку образцов ультразвуком в течение 1 мин с использованием ультразвукового гомогенизатора (Bandelin SONOPULS, Германия) при мощности 7 Вт. Далее полученную суспензию перемешивали на орбитальном шейкере в течение 24 ч. Эффективность модификации карбоксиметилцеллюлозой и иммобилизацию фермента лизоцима определяли с помощью метода динамического светорассеяния и микроэлектрофореза (Zetasizer Nano ZS, Malvern, Великобритания) с использованием стандартных U-образных кювет.

Результаты. После модификации карбоксиметилцеллюлозой дзета-потенциал монтмориллонита и каолина составил - 50,9±4,0 и - 40,7±3,2 мВ, а гидродинамический диаметр – 1732,3±0,8 и 761,9±0,6 нм, соответственно. Иммобилизация лизоцима на модифицированном каолине привела к изменению дзета-потенциала до - 30,2±2,4 мВ и гидродинамического размера до 568,9±0,5 нм. Нанокомпозит на основе лизоцима и монтмориллонита характеризовался изменением дзета-потенциала до -34,5±2,7 мВ и гидродинамического размера до 1642,0±0,9 нм.

Заключение. На основе исследования гидродинамического размера и дзета-потенциала разработан метод модификации карбоксиметилцеллюлозой монтмориллонита и каолина. Однако эффективность иммобилизации лизоцима требует проведения дополнительных исследований. Наблюдаемое снижение дзета-потенциала может быть следствием наличия лизоцима на поверхности, в

то время как механизм уменьшения гидродинамического размера полученных нанокомпозитов требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: каолин, монтмориллонит, лизоцим, карбоксиметилцеллюлоза, нанокомпозиты.

Работа выполнена при поддержке Российского научного Фонда и Академии наук Республики Татарстан по проекту № 24-26-20074.

1. Awad M.E., López-Galindo A., Setti M., El-Rahmany M.M., Iborra C.V. Kaolinite in pharmaceutics and biomedicine // International journal of pharmaceutics. – 2017. – V. 533. – № 1. – P. 34 – 48.
2. Hossain S.I., Kukushkina E.A., Izzi M., Sportelli M.C., Picca R.A., Ditaranto N., Cioffi N. A review on montmorillonite-based nanoantimicrobials: state of the art // Nanomaterials. – 2023. – V. 13. – № 5. – P. 848.

УДК:606:61

Создание генетически модифицированных клеток для восстановления активности β -гексозаминидазы А

***Б.Р. Каюмова¹, Т.С. Царегородцева¹, А.А. Губайдуллина¹, А.А. Шаршакова^{1,2},
А.А. Шаймарданова^{1,2}***

E-mail: beatakayum@icloud.com

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 20008, Россия

²НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии. Казань, 420021, Россия

Введение. В мире существует свыше 7000 редких (орфанных) заболеваний, 80 % из которых являются наследственными. По приблизительным оценкам, около 320 миллионов человек по всему миру страдают от редких наследственных заболеваний [1]. Одной из актуальных задач является разработка новых методов лечения этих заболеваний, среди которых выделяются генная и клеточная терапия. Низкая распространенность GM2-ганглиозидозов (от 1 до 100 000 до 1 500 000 в зависимости от конкретного заболевания), значительная степень инвалидности у пациентов в детском возрасте и отсутствие эффективных методов лечения делают эту группу заболеваний приоритетной для применения генно-инженерных подходов в терапии [2]. На основании этих данных была поставлена цель: оценить ферментативную активность β -гексозаминидазы А после введения генетически модифицированных рекомбинантными аденоассоциированными вирусами кодирующими кДНК генов *HEXA* и *HEXB* человека. Полученные результаты позволят судить о степени эффективности метода в лечении GM2-ганглиозидоза.

Материалы и методы. В работе были исследованы линии первичных эмбриональных клеток почки человека HEK293. Клетки HEK293 и AAV293 культивировали в полной питательной среде DMEM/F12 при 37 °C во влажной атмосфере с 5 % содержанием CO₂. Для получения рекомбинантного AAV-HEXA-HEXB прово-

дили кальций-фосфатную ко-трансфекцию пакующей линии клеток HEK293. Адноассоциированные вирусы AAV-HEXA и AAV-HEXB получали с помощью AAVhelper-freesystem (Кат. №240071, Agilent technologies). Через 48 ч после трансдукции в кондиционированной среде генетически модифицированных клеток HEK293T анализировали ферментативную активность HexA с использованием флуоресцентного субстрата MUGS.

Результаты. Генетическая модификация клеток приводит к сверхэкспрессии генов *HEXA* и *HEXB* и увеличению ферментативной активности HexA в кондиционированной среде более чем в 8 раз, сравнительно с контрольными клетками.

Заключение. Полученные данные позволяют предположить безопасность и эффективность разработанного метода клеточно-опосредованной генной терапии GM2-ганглиозидозов.

Ключевые слова: генная терапия, GM2-ганглиозиды, адноассоциированный вирус, гены *HEXA* и *HEXB*.

1. Cachon-Gonzalez M.B. Genetics and Therapies for GM2 Gangliosidosis / M.B. Cachon-Gonzalez, E. Zaccariotto, T.M. Cox // *Curr Gene Ther.* – 2018. – V. 18. – P. 68 – 89.
2. Leal A.F. GM2 Gangliosidoses: Clinical Features, Pathophysiological Aspects, and Current Therapies / A.F. Leal, E. Benincore-Florez, D. Solano-Galarza, R.G. Garzon Jaramillo, O.Y. Echeverri-Pena, D.A. Suarez, C.J. Almeciga-Diaz, A.J. Espejo-Mojica // *Int J Mol Sci.* – 2020. – V. 21. – Article ID 6213.

УДК: 577.112

Влияние температуры и времени гидролиза на степень гидролиза белков мясного полуфабриката

А.Н.Охотникова¹, И.В.Осипова²

E-mail: anastasiaohotnikova55377@gmail.com

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Россия

Введение: Белковые гидролизаты – это частично расщеплённые белки, которые представляют собой смесь различных пептидов и свободных аминокислот. На их основе получают различные вещества, активно применяемые в практике. Примером могут послужить кровезаменители, препараты для парентерального питания в медицине; препараты для компенсации белкового дефицита, повышения резистентности и для улучшения развития молодняка сельскохозяйственных животных в ветеринарии; гидролизаты белков применяются как источник аминокислот и пептидов для бактериальных и культуральных питательных сред в биотехнологии. Также было доказано, что в результате расщепления белка улучшаются его эмульгирующие, влагосвязывающие свойства, термоустойчивость и растворимость, что делает его более удобным для использования в составе продуктов питания в пищевой промышленности [1]. Ферментативные методы гидролиза являются перспективными и эффективными методами получения гидролизатов, они позволяют проводить гидролиз в более мягких и щадящих условиях в сравнении с химическими

методами, т.е. методами с применением кислот и щелочей. Использование ферментов позволяет интенсифицировать технологические процессы, улучшить качество готовой продукции, увеличить ее выход, сэкономить пищевое сырье, т.к. их применение способствует ускорению одновременно несколько технологических процессов, благодаря чему их широко применяют на производстве в различных отраслях [2]. Гидролиз проходит в зонах pH, соответствующих максимумам активности ферментов: чаще в нейтральной, слабощелочной или слабокислой среде, оптимум температур соответствует 35–50 °C; у некоторых ферментов этот порог может подниматься до 80 °C [3].

Материалы и методы. В работе был использован один из коммерческих ферментов, используемых в пищевой промышленности – Flavourzyme. Его применяют для улучшения вкуса и аромата различных продуктов. Фермент содержит ряд различных протеаз и амилаз и может быть использован для гидролиза мясных продуктов. Оптимальными условиями гидролиза с использованием Flavourzyme являются pH 5–7,5; температура 40–65 °C; концентрация фермента 0,05–0,5% по отношению к массе субстрата. Исследование проводилось с целью подбора оптимальных условий для проведения гидролиза мясного полуфабриката ферментативным методом. В качестве белкового субстрата использовали фарш индейки. Проводился ряд экспериментов при различных температурах (40–70 °C) с постоянной концентрацией фермента – Flavourzyme (0,2%) и постоянным значением pH≈6–6,5. О степени гидролиза судили по изменению массовой доли аминного азота, концентрации белка, массы осадка, полученного при добавлении трихлоруксусной кислоты (ТХУ), оптической плотности раствора после добавления ТХУ. Степень гидролиза оценивали, сравнивая фракционный состав до и после гидролиза по результатам электрофореза в градиентном полиакриламидном геле.

Результаты. На основе полученных в ходе эксперимента данных, можно сделать вывод о том, что наиболее эффективно гидролиз проходит при температуре 60–65 °C. При возрастании температуры от 40 до 70 °C степень гидролиза увеличивается почти на 40%. При увеличении же времени эксперимента степень гидролиза в среднем возрастает на 13%. Количество аминного азота резко увеличивается в первые часы гидролиза, после 6 ч увеличение незначительно, поэтому проводить гидролиз больше 6 ч нецелесообразно. Трихлоруксусная кислота (ТХУ) является специфическим реактивом на белок и широко используется в исследовательской практике, т.к. способна осаждать только белки и не действовать на продукты их распада – пептиды, аминокислоты и др., однако в зависимости от концентрации осаждаются разные по молекулярной массе белки. 5% ТХУ способна осаждать белки с молекулярной массой не менее 10 кДа, в отличие от 25%, которая в свою очередь осаждает более мелкие молекулы от 6 кДа. На основании этих данных мы определили, что около 25% всех белков в гомогенате, подвергнутому 28 часам гидролиза, составляют гидролизованные белки с молекулярной массой в пределах 6–10 кДа. Электрофорез в градиентном полиакриламидном гелеобразцов до и после гидролиза показал, что в образце до гидролиза преобладают белки с молекулярной массой около 50 кДа. Значительная часть белков в образце после гидролиза гидролизовалась до

пептидов с молекулярной массой менее 10 кДа, а белков, не подвергшихся гидролизу в растворе, практически не оказалось. На основании электрофореграмм мы также можем предположить, что часть белков расщепилась до свободных аминокислот, которые не видны при данном методе электрофореза.

Заключение. Оптимальными условиями получения частично гидролизованного белка ферментом Flavourzyme в концентрации 0,2% при $\text{pH} \approx 6-6,5$ являются температура в диапазоне 60–65°C и время проведения гидролиза не более 6 ч.

Ключевые слова: белковые гидролизаты, Flavourzyme, ферментативный гидролиз, пищевая промышленность.

1. Clemente, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition / A. Clemente // Trends in Food Science & Technology. – 2000. – V. 11. – P. 254–262.
2. Ovissipour M., Abedian A.M., Motamedzadegan A. et al. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera // Food Chemistry. – 2009. – V. 115. – P. 238–242.
3. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение/Л.Я. Телишевская под редакцией А. Н. Панина. – Москва, 2000. – 296 с.

УДК: 57.085.23

Оценка влияния цитохалазин-индуцированных микровезикул на миграционную и пролиферативную активность дермальных фибробластов человека *in vitro*

В.Ю. Сыромятникова, А.И. Квон, М.О. Гомзикова

E-mail:lera181990@mail.ru

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Заживление ран, особенно хронических, является одной из основных проблем в области биомедицины. По оценкам, примерно 1–2% населения мира страдают от хронических ран, что оказывает значительное влияние на качество жизни пациентов [1]. Таким образом, требуется создание более эффективных подходов к лечению ран. Одним из наиболее перспективных подходов является использование внеклеточных везикул мезенхимных стволовых клеток (МСК). Везикулы, благодаря способности переносить факторы роста, могут изменять биологическую активность клеток-мишеней, стимулируя пролиферацию и миграцию. Целью данного исследования является оценка влияния цитохалазин-индуцированных микровезикул (МВ) на миграционную и пролиферативную активность дермальных фибробластов человека (HDF) *in vitro*.

Материалы и методы. Влияние цитохалазин-индуцированных МВ на миграцию и пролиферацию HDF оценивали с помощью метода «царапины» («Scratch Assay») по протоколу, описанному Martinotti S. и Ranzato E [2]. В лунки 12-луночного планшета высевали по 100 тыс. ТЕС мыши. На следующий день создали царапины в монослое клеток, используя наконечник пипетки. После формирования царапины аккуратно промывали клеточный монослой для удаления открепившихся клеток. Производили замену среды на свежую, содержащую 1%

FBS, и цитохалазин-индуцированные MB, полученные от 200 тыс. МСК жировой ткани, по протоколу Picket.al с модификациями. В качестве контроля служили клетки, в которые добавляли только питательную среду с 1% FBS. Клетки помещали в стандартные условия инкубатора для клеточных культур. Оценку пролиферации производили через 16 ч. Анализ изображений производили с помощью программного обеспечения ImageJ.

Результаты. Спустя 16 ч инкубации культуры HDF с MB расстояние между краями царапины сократилось на 74,5%, в то время как в контроле на 31,1%.

Заключение. Цитохалазин-индуцированные MB, полученные из МСК, значительно увеличивали миграционную и пролиферативную активность HDF, что может способствовать ускоренному заживлению ран.

Ключевые слова: везикулы, мезенхимальные стволовые клетки, цитохалазин, хронические раны.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №23-25-00282.

1. De Francesco F., Ogawa R. From Time to Timer in Wound Healing Through the Regeneration// Cell Biology and Translational Medicine. – 2024. – V. 22 – P. 1 – 18.
2. Martinotti S., Ranzato E. Scratch Wound Healing Assay // Epidermal cells: methods and protocols. – 2020. – P. 225 – 229.
3. Pick H. et al. Investigating cellular signaling reactions in single attoliter vesicles // Journal of the American Chemical Society. – 2005. – V. 127. – №. 9. – P. 2908 – 2912.

УДК: 581.1

Получение рекомбинантного лектина льна семейства Legume в растительной системе экспрессии

Н.Г. Сырчина, Н.В. Петрова

E-mail: ngsyrchina@gmail.com

КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, 420111, Россия;

Введение. Лектины относятся к группе углеводов-распознающих белков, при этом не проявляют ферментативной активности в отношении распознаваемого углевода, в отличие от другой группы белков, содержащих «углевод-связывающие модули» (carbohydrate-binding modules – CBM), и модифицирующих углевод, с которым прошло взаимодействие [1]. Лектины встречаются во всех царствах живой природы, а их изучение началось с открытия токсичных свойств рицина, выделенного из семян клещевины (*Ricinus communis*). На протяжении более чем века исследований лектинов растительные представители этой группы белков привлекали внимание сначала как важный элемент защиты растений от патогенов и потенциальный источник запасных питательных веществ, а в последние десятилетия как маркеры различных внутренних процессов в организме [2].

Рецепторные киназы с Legume-доменом играют ключевую роль во взаимодействии растений с другими организмами, включая насекомых, бактерии, оомицеты и грибы, и являются важными компонентами защитных систем растений

[3]. Тем не менее, растительные лектины семейства Legume (PF00139) остаются недостаточно изученными. В связи с этим была поставлена задача получения рекомбинантного льняного лектина Lus10021117, демонстрирующего тканеспецифичный характер экспрессии (ткани с первичной клеточной стенкой) в растительной экспрессионной системе табака (*Nicotiana benthamiana*). Выбор данной системы обусловлен необходимостью сохранить посттрансляционные модификации белковой молекулы, специфичные для растений. В дальнейшем рекомбинантный белок будет использован для оценки углеводной специфичности с целью установления роли лектинов в процессах специфичных для тканей с первичной клеточной стенкой.

Материалы и методы. В ходе исследования была выделена РНК из апикальной части стебля льна, которая послужила матрицей для биосинтеза кодирующей ДНК. С использованием ПЦР были получены ампликон кодирующей последовательности гена Lus10021117, а также ампликон последовательности его углевод-связывающего домена. Ампликоны были клонированы в линейаризованный вектор, обработанный рестриктазами, с помощью реакции лигирования. Полученные генетические конструкции были трансформированы в штамм *E. coli* TOP10 для размножения. Выделенные колонии прошли селективный отбор на питательной среде с антибиотиком, после чего из них были выделены плазмиды для переноса ампликонов из донорного вектора в бинарный вектор, который также был размножен с использованием *E. coli*. Плазмиды, выделенные из селективно отобранных колоний, были трансформированы в штамм *A. tumefaciens* GV3101 с помощью электропорации. Этот штамм затем использовался для инфильтрации листьев табака. Через неделю после инфильтрации листья табака были зафиксированы в жидком азоте, и из них были выделены белки методом фенольной экстракции. Эффективность наработки рекомбинантного белка в растительной системе была оценена с помощью белкового электрофореза и последующего иммунно-блоттинга (антитела к His-tag, которым мечен рекомбинантный белок).

Результаты. Полученные генетические конструкции, содержащие ампликон гена Lus10021117 и ампликон последовательности его углевод-связывающего домена, прошли многоэтапный селективный отбор перед тем, как ими были инфильтрированы растения табака. Электрофорез и иммунно-блоттинг, проведенные для фенольной экстракции белков, показали успешную наработку рекомбинантного белка, имеющего только углевод-связывающий домена гена Lus10021117, однако рекомбинантный белок с полной последовательности гена на данном этапе работы не был получен.

Заключение. Полученный в результате работы рекомбинантный углевод-связывающий домен лектина Lus10021117 может быть использован для анализа углеводной специфичности лектина. Однако для более точной характеристики функциональной роли белка необходимо получение полноценной белковой молекулы, что требует продолжения исследований.

Ключевые слова: лектин, рекомбинантный белок, углеводная специфичность, электрофорез, иммунно-блоттинг

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №24-24-00516.

1. Van Damme E. J. M., Lannoo N., Peumans W. J. Plant lectins. // Adv. Botanic. Res. – 2008. – V. 48. – P. 107 – 209.
2. Van Damme E.J.M. 35 years in plant lectin research: a journey from basic science to applications in agriculture and medicine // Glycoconjugate J. – 2022. – V. 39. – P. 83.
3. Bellande K., Bono J.J., Savelli B., Jamet E., Canut H. Plant lectins and lectin receptor-like kinases: how do they sense the outside? // Int. J. Mol. Sci. – 2017. – V. 18. – P. 1164.

УДК: 578.226

Анализ уровня ферментативной активности арилсульфатазы А в клетках НЕК293 после генетической модификации с помощью рекомбинантного аденоассоциированного вируса

**Т.С. Царегородцева, А.А. Губайдуллина, Б.Р. Каюмова, А.А. Шаршакова,
А.А. Шаймарданова**

E-mail: tanyatsa03@gmail.com

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Лизосомные болезни накопления (ЛБН) – это группа генетических заболеваний, вызванных мутациями в генах, отвечающих за работу ферментов лизосом. Эти ферменты играют ключевую роль в расщеплении сложных молекул и транспортировке липидов. Сбой в этих важных процессах ведет к гибели клеток. Хотя клинические проявления ЛБН могут сильно различаться, более половины из них сопровождаются симптомами нейродегенерации [1]. Метахроматическая лейкоцидистрофия (МЛД) является одним из типов лизосомных болезней накопления и проявляется прогрессирующей нейродегенерацией и ухудшением когнитивных возможностей [2]. Причиной МЛД является недостаток фермента арилсульфатазы А (ARSA) (OMIM 250100), что приводит к накоплению сульфатидов в олигодендронитах, микроглии, клетках центральной нервной системы (ЦНС), шванновских клетках, макрофагах периферической нервной системы (ПНС) и клетках внутренних органов. Это накопление вызывает дегенерацию нейронов, нарушает функцию астроцитов и инициирует воспалительный процесс [3]. Цель работы – создать рекомбинантный аденоассоциированный вирус (AAB), несущий ген арилсульфатазы А (ARSA) для повышения ферментативной активности в клетках и оценка потенциальных терапевтических преимуществ этого подхода при лечении метахроматической лейкоцидистрофии.

Материалы и методы. В работе были исследованы линии первичных эмбриональных клеток почки человека НЕК293Т. Клетки НЕК293 и AAB293 культивировали в полной питательной среде DMEM/F12 при 37 °С во влажной атмосфере с 5%-ным содержанием CO₂. Рекомбинантный вирус AAB-ARSA получали путем ко-трансфекции клеток AAB293 с использованием кальций-фосфатного метода. Эффективность экспрессии ARSA в генетически модифицированных клетках НЕК293Т подтверждали путем оценки ферментативной активности.

Результаты. Ферментативная активность ARSA в генетически модифицированных клетках HEK293T после 3 суток была 2 раза выше ($p < 0.0001$), чем в нативных клетках HEK293T. Это указывает на успешную трансдукцию и сверхэкспрессию ARSA в клетках HEK293T, генетически модифицированных вирусом AAB-ARSA.

Заключение. Аденоассоциированные вирусы представляют собой перспективный инструмент в лечении нейродегенеративных заболеваний благодаря своей уникальной способности преодолевать гематоэнцефалический барьер. Полученные результаты открывают новые перспективы для дальнейшего развития генной терапии в лечении МЛД и других нейродегенеративных заболеваний человека.

Ключевые слова: арилсульфатазы А, аденоассоциированный вирус, генная терапия, лизосомные болезни накопления.

1. Lamichhane A. Metachromatic Leukodystrophy / A. Lamichhane, F.R. Cabrero // StatPearls [Internet]. – StatPearls Publishing, 2023.
2. Jonckheere A.I. Metachromatic leukodystrophy: To screen or not to screen? / A.I. Jonckheere, S.D.K. Kingma, F. Eyskens, V. Bordon, A.C. Jansen // European Journal of Paediatric Neurology. – 2023. – P. 1 – 7.
3. Amr K. Clinical, Biochemical, and Molecular Characterization of Metachromatic Leukodystrophy Among Egyptian Pediatric Patients: Expansion of the ARSA Mutational Spectrum / K. Amr, E. Fateen, L. Mansour, A.M. Tosson, M.S. Zaki et al // Journal of Molecular Neuroscience. – 2021. – V. 71. – P. 1112 – 1130.

УДК: 577.2.086/.087

Кросс-коррекция дефицита β -гексозаминидазы А с использованием генетически модифицированных мезенхимальных стволовых клеток человека в культуре клеток пациента с Болезнью Тея-Сакса

А.А.Шаршакова, А.А.Шаймарданова, Ибрахим Ахмад, Б.Р.Каюмова, Т.С.Царегородцева, А.А.Губайдуллина, В.В.Соловьева, А.А.Ризванов

E-mail: sharshakova.00@mail.ru

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Введение. Болезнь Тея-Сакса – редкое аутосомно-рецессивное заболевание, относящееся к группе GM2-ганглиозидозов и вызванное нарушением ферментативной активности β -гексозаминидазы А (HexA), лизосомного фермента, играющего важную роль в метаболизме GM2-ганглиозидов. Дефицит HexA вызывает накопление GM2-ганглиозидов преимущественно в клетках нервной системы, что приводит к тяжелой прогрессирующей нейродегенерации [1, 2]. В настоящее время не разработано эффективного метода лечения БТС, так как существующая терапия не предотвращает обострения неврологических нарушений у пациентов. На данный момент наиболее перспективным методом лечения является генно-клеточная терапия. Настоящая работа направлена на исследование возможности восстановления дефицита HexA в клетках больного БТС с помощью генетически модифицированных мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Материалы и методы. МСК были выделены из жировой ткани человека и генетически модифицированы рекомбинантными аденоассоциированными вирусами, содержащими уникальные кодон-оптимизированные кДНК генов α - (HEXA) и β -субъединиц (HEXB) HexA (МСК-HEXA-HEXB). МСК-HEXA-HEXB культивировали с МСК пациента с БТС (мутМСК) в системе Transwell. Через 7 дней изучали эффективность кросс-коррекции дефицита HexA. Концентрацию HEXA в клеточных лизатах определяли с помощью ELISA. Число копий генов HEXA и HEXB определяли с помощью количественной ПЦР. Детекцию белков HEXA и HEXB проводили с помощью ИЦХ и вестерн-блот анализа.

Результаты. После доставки HexA путем кросс-коррекции в системе Transwell мутМСК содержали $72903,12 \pm 14026,65$ и $80899,7 \pm 20847,92$ копий кодон-оптимизированных генов HEXA и HEXB соответственно на 1 мкг тотальной РНК. Концентрация HEXA в клеточных лизатах мутМСК ($0,71 \pm 0,07$ нг/мкл) после кросс-коррекции увеличилась в 2,25 раза по сравнению с нативными мутМСК ($0,30 \pm 0,027$ нг/мкл). Как α -, так и β -субъединицы HexA были обнаружены в мутМСК с использованием ИЦХ и вестерн-блот анализа после кросс-коррекции дефицита фермента.

Заключение. Таким образом, эффективность кросс-коррекции дефицита HexA была показана в мутМСК пациента с БТС при взаимодействии с МСК-HEXA-HEXB. Такая коррекция может быть опосредована везикулярным транспортом и доставкой HexA через внеклеточные везикулы МСК-HEXA-HEXB.

Ключевые слова: β -гексозаминидаза А, мезенхимальные стволовые клетки, генно-клеточная терапия.

Работа выполнена при финансировании Государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету по госзаданию № 0671-2020-0058 в сфере научной деятельности.

1. Cachon-Gonzalez M.B. Genetics and therapies for GM2 gangliosidosis / M. B. Cachon-Gonzalez, E. Zaccariotto, T. M. Cox // Current gene therapy. – 2018. – V. 18. – P. 68 – 89.
2. Leal A.F. GM2 gangliosidoses: clinical features, pathophysiological aspects, and current therapies / A. F. Leal, E. Benincore-Florez, D. Solano-Galarza, R. G. G. Jaramillo, O. Y. Echeverri-Pena, D. A. Suarez, C. J. Almeciga-Diaz, A. J. Espejo-Mojica // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – V. 21. – №. 17. – P. 6213 – 6236.

Клеточные и ДНК-сенсоры для исследования биохимических процессов

Л.Е. Агафонова¹, Д.Д. Жданов¹, И.В. Вахрушев¹, К.Н. Ярыгин¹, В.В. Шумянцева^{1,2}

E-mail: agafonovaluba@mail.ru

¹ФГБНУ НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
г. Москва, 119121, Россия;

²ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России,
г. Москва, 117997, Россия

Введение. Многие важные процессы в организме происходят с участием электронов в качестве доноров или акцепторов (дыхание и обмен веществ, осуществляемые за счёт окислительно-восстановительных реакций, передача нервных импульсов, перенос электронов на внутренних и внешних мембранах клеток, и др.). Следовательно, могут быть зарегистрированы с помощью электрохимических методов, которые по своей точности, экспрессности, стоимости, расходным материалам и компактности оборудования являются перспективной альтернативой стандартизованным методам. Электроанализ позволяет регистрировать белковые молекулярные профили (сигнатуры) по окислению электроактивных аминокислот, входящих в состав белков (тирозин, триптофан, цистеин, гистидин, цистин, метионин) и нуклеотидные молекулярные профили (после выделения ДНК, РНК) клеток по электроокислению гетероциклических оснований. Восстановление поврежденного суставного хряща представляет актуальную медицинскую проблему. Хондросферы самостоятельно производят и накапливают внеклеточный матрикс (ВКМ), поэтому являются перспективными конструкциями для регенеративной медицины. Мониторинг процесса программируемой клеточной гибели (апоптоза) может помочь для ранней диагностики заболеваний и для оценки эффективности лекарств. Фрагментация ДНК является эффективным маркером апоптоза.

В связи с вышеизложенным была поставлена цель: разработать электрохимические сенсоры для количественной оценки накопления ВКМ в хондросферах с целью эффективной регенеративной терапии суставного хряща и для анализа фрагментации ДНК как маркера апоптоза. Полученные результаты могут найти практическое применение для контроля качества хондросфер и для мониторинга деградации ДНК с высокой чувствительностью.

Материалы и методы. Фрагменты суставного хряща получали из реберной дуги человека. Сфероиды формировали с использованием 96 луночных планшетов из низкоадгезивного пластика (Corning, США) в стандартных условиях с индуктором дифференцировки 10 нг/мл TGF- β 1 (PeproTech, США) в течение 3-х недель. В качестве контроля использовали сфероиды до добавления TGF- β 1 в среду. Оценку накопления ВКМ проводили методом гистохимического

окрашивания образцов по Массону (общий коллаген), 1% раствором альцианового синего (Sigma, США) и гематоксилином (Биовитрум, Россия) Майера (гликозаминогликаны).

Для анализа целевой фрагментации и деградации использовали высокомолекулярную кольцевую плазмиду pTagGFP2-N (Евроген, Россия) с молярной массой 1.891.600 Да, которую трансформировали в штамм *Escherichia coli* XL1. Плазмиду очищали, фрагментировали на 4 и 23 части с помощью специфических рестриктаз BstMC I и AluB I, соответственно, и деградировали неспецифической эндонуклеазой I на 3-70мерные фрагменты (СибЭнзим, Россия). Для индукции апоптоза к растущим клеткам добавляли 20 Ед/мл L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* (ИБМХ, Москва). Геномную ДНК выделяли из апоптотических клеток клеточной линии лейкоза человека K562 (ATCC, Manassas, Вирджиния). Визуализацию фрагментов ДНК проводили в 1,5% агарозном геле-электрофорезе. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали под ультрафиолетовым светом в системе визуализации ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad, Hercules, Калифорния). Для измерения апоптоза клеток использовали набор FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis kit (Life Technologies, Carlsbad, Калифорния). Подсчет 5×10^4 клеток в каждой точке проводили методом проточной цитометрии на приборе MACS Quant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Германия) по протоколу. Количество клеток с поврежденной ДНК определяли методом TUNEL (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Массачусетс).

Электрохимические измерения осуществляли в 0,1 М калий фосфатном буфере (рН = 7,4) на потенциостате PalmSens (PalmSens BV, Нидерланды) с программным обеспечением PStace (версия 5,8), с использованием печатных графитовых электродов (КолорЭлектроникс, Россия), модифицированных дисперсией одностенных углеродных нанотрубок (OCSiAl, Россия). Электроанализ ДНК после воздействия ферментов рестрикции и при апоптозе проводили методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии в диапазоне потенциалов (0,0 $\cap$ +1,2) В. Для увеличения чувствительности электрохимическое профилирование хондросфероидов осуществляли методом квадратно-волновой вольтамперометрии в диапазоне потенциалов (0,2 $\cap$ +1,2) В.

Результаты. Методом квадратно-волновой вольтамперометрии у контрольных хондросфер зарегистрирован один интенсивный пик при потенциале $E=0,53 \pm 0,01$ В и «плечо» при потенциале $E=0,91 \pm 0,01$ В. У дифференцированных хондросфер – два интенсивных пика электроокисления при потенциалах $E=+0,52 \pm 0,01$ В и $E=+0,88 \pm 0,01$ В. Для количественного сравнения дифференцированных и контрольных хондросфер полученные величины амплитуд токов электроокисления нормировали на 1 мкг/мл ДНК, измеренную в образцах. У дифференцированных хондросфер по сравнению с контрольными сфероидами токи пиков электроокисления увеличились на 13% и 66% для первого и второго пика, соответственно, что подтверждало накопление экстрацеллюлярного матрикса при культивировании с TGF- β 1 в течение 21 суток.

Методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии кольцевая плазида детектировалась как один широкий пик в области электроокисления

гетероциклических оснований (ГЦО) при потенциале $E=0,50\pm0,01$ В. При фрагментации плазмиды на 4 части с помощью специфической рестриктазы BstMC I регистрировали два пика, соответствующие электроокислению ГЦО при потенциалах $E_1=0,50\pm0,01$ В и $E_2=0,70\pm0,01$ В. При фрагментации плазмиды pTagGFP2-N на 23 части при воздействии рестриктазы AluB I зарегистрирован 16% рост интенсивности максимальной амплитуды тока электроокисления при $E=0,50\pm0,01$ В. Полностью деградированная неспецифической эндонуклеазой I плазида демонстрировала интенсивные сигналы электроокисления ГЦО ДНК, смещенные в положительную область потенциалов по сравнению с кольцевой плазмидой и частично фрагментированными образцами ДНК.

Заключение. Сравнительный электроанализ позволил зарегистрировать различия в условиях культивирования клеток, количественно охарактеризовать трёхмерные клеточные сфероиды. При индуцированной дифференцировке хондроцитов зарегистрировано накопление экстрацеллюлярного матрикса, что отражалось в увеличении максимальных амплитуд токов электроокисления дифференцированных хондросфер по сравнению с контрольными сфероидными и согласовывалось с данными гистохимического окрашивания.

На основе данных по электроанализу плазмидной ДНК сделаны следующие выводы: с увеличением числа фрагментов при повреждении ДНК (i) увеличивалось количество регистрируемых пиков, соответствующих электроокислению ГЦО, (ii) росла интенсивность максимальной амплитуды токов электроокисления ГЦО. С помощью разработанного метода проведен мониторинг фрагментации и деградации кольцевой плазмиды с высокой чувствительностью (до 10 нг/мкл). Ранний и поздний апоптоз был диагностирован в клетках лейкоза человека K562 по анализу геномной ДНК. Электрохимический анализ был подтвержден с помощью традиционных методов анализа ДНК и регистрации апоптотического процесса, таких как гель-электрофорез и проточная цитометрия.

Ключевые слова: электрохимические сенсоры, хондросферы, мониторинг апоптоза, дифференциально-импульсная вольтамперометрия.

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

Анализ компонентов опухолевой стромы у пациентов с раком молочной железы на основе РНК секвенирования единичных клеток

*А.А. Богомазова¹, М.А. Золотых¹, Ю.В. Филина¹, А.Р. Рахматуллина¹,
Е.А. Булыгина¹, А.М. Гимранов², Р.Р. Мифтахова¹*

E-mail: arnbgmz@yandex.ru

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г.Казань, 420008, Россия;

²ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ имени профессора М.З. Сигала», г. Казань, 420029, Россия

Введение. Тканевое микроокружение опухоли может составлять до 90% массы новообразования. Опухолевая строма играет ключевую роль в развитии солидных опухолей и определяет их пролиферативные свойства, инвазию, метастазирование, формирование иммунного ответа и ответа на терапию [1]. Строма опухоли преимущественно состоит из фибробластов, внеклеточного матрикса, иммунных клеток и сосудистой сети. Соотношение опухоль-строма рассматривается как независимый прогностический фактор при различных типах онкологических заболеваний, включая рак молочной железы (РМЖ). Ozturki с соавт. определили, что высокий уровень стромы влиял на показатели общей выживаемости пациентов с РМЖ, а также был ассоциирован с наличием метастазов в лимфатических узлах в группе пациентов с люминальным А и В подтипами РМЖ [2]. В связи с этим, настоящее исследование посвящено анализу компонентов опухолевой стромы при гормонозависимом РМЖ на основании данных секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq).

Материалы и методы. Исследование проводилось на опухолевом постоперационном материале пациентов с первичным дольковым РМЖ (n=3) гормонозависимого типа. Суспензия клеток была получена методами механической и ферментативной диссоциации путем инкубации с коллагеназой II типа и последующей фиксации в этиловом спирте при -20 °С. Для анализа транскриптома проводили РНК-секвенирование единичных клеток (scRNA-seq). Библиотеки scRNA-seq готовили с использованием системы Chromium и набора реагентов ChromiumSingleCell 3' ReagentKit (v3.1), 10xGenomics. Секвенирование проводили с помощью системы NextSeq500, Illumina. Анализ данных и выделение клеточных популяций проводили с помощью программного обеспечения LoupeBrowser 6 на основании экспрессии генов-маркеров. Статистический анализ был проведен с использованием языка программирования Python с применением библиотек pandas, numpy и scipy.

Результаты. Результаты анализа клеточного состава опухолевой ткани молочной железы на основе 3519 клеток, полученных из биоптатов опухолей трех пациентов с гормонозависимым РМЖ, позволили определить содержание 15 типов клеток (Таблица 1).

Анализ коэффициентов ранговой корреляции Спирмена выявил

статистически значимые результаты ($p < 0,05$) между содержанием различных компонентов опухолевой стромы и экспрессией ключевых прогностических генов при РМЖ. Ожидается, была выявлена положительная корреляция между значением пролиферативного индекса Ki-67 и содержанием клеток эпителиального происхождения. Также показана положительная ассоциация уровня экспрессии прогестероновых рецепторов (ПР) опухолевыми клетками (ОК) с присутствием резидентных и опухоль-ассоциированных фибробластов (ОАФ). Ранее было показано, что ОАФ секретируют высокие дозы эстрогена и прогестерона, модулируя экспрессию ПР на ОК [4]. При этом высокие дозы прогестерона значительно снижают активность Т-клеток [5], что в нашем исследовании было подтверждено отрицательной корреляцией между экспрессией ПР и содержанием Т-лимфоцитов и НК-клеток. Высокие дозы прогестерона также связывают со снижением эффективности иммунотерапии у пациентов с РМЖ [6].

Таблица 1.

Тип клеток		Гены-маркеры	Среднее значение %	Стандартное отклонение
Опухолевые клетки		EPCAM+, ERBB2+, ESR1+, PGR+	12,16	±2,39
Нормальные эпителиальные клетки		EPCAM, ERBB2-, ESR1-, PGR-	6,05	±3,14
Стромальные клетки	Резидентные фибробласты	COL1A2, COL1A1, DCN, FAP-	5,14	±3,47
	Опухоль-ассоциированные фибробласты	COL1A2, COL1A1, FAP+	10,46	±8,71
	Клетки гладкой мускулатуры	ACTA2, CNN1	2,33	±3,58
	Адиipoциты	FABP4	3,45	±3,84
	Эндотелиальные клетки	PECAM1	4,52	±1,99
Иммунные клетки	Т-лимфоциты	CD3D, CD3G	3,29	±1,53
	В-лимфоциты	CD79A	1,90	±1,34
	Макрофаги	C1QA, C1QB, C1QC	1,61	±1,51
	НК-клетки	GNLY, NKG7	1,39	±0,56
	Дендритные клетки (ДК)	LAMP3	1,19	±0,55
	Плазмoцитoидные ДК	IL3RA+, LILRA4+	8,22	±4,01
	Плазматические клетки	JCHAIN, MZB1	1,19	±1,52
	Тучные клетки	CPA3	0,77	±0,23

Положительная корреляция была отмечена между содержанием эндотелиальных клеток и популяциями дендритных клеток, макрофагов, тучных клеток, НК-клеток, Т-лимфоцитов, гладкомышечных клеток и адипоцитов. Продemonстрированное привлечение стромального и иммунного компонента может являться результатом усиленной васкуляризации, ассоциированной с активацией эндотелиальных клеток, и представлять потенциальный прогностический маркер определения соотношения опухоль-stroma.

Заключение. Исследование подтверждает важность опухолевой стромы в

патогенезе гормонозависимого РМЖ, выявляя значимые корреляции между клеточным составом стромы и экспрессией ключевых прогностических маркеров. Полученные данные подчеркивают потенциал анализа стромальных компонентов в прогнозе развития и терапии РМЖ.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 22-74-10115

1. Gottschalk S., Karkala S., Williams L., Song X.T. Abstract IA26: Stroma-targeted immunotherapy // Molecular Cancer Research – 2013. – 11(10_Supplement) - IA26-IA26.
2. Ozturk C., Okcu O., Şen B., & Bedir R. An easy and practical prognostic parameter: tumor–stroma ratio in Luminal, Her2, and triple-negative breast cancers // Revista Da Associação Médica Brasileira.- 2022. – V. 68(2). – P.227–233.
3. Yan D., Ju X., Luo B., Guan F., He H., Yan H., Yuan J. Tumour stroma ratio is a potential predictor for 5-year disease-free survival in breast cancer // BMC cancer. –2022. – V. 22(1). – P.1082.
4. Diep C.H., Spartz A., Truong T.H., Dwyer A.R., El-Ashry D., Lange C.A. Progesterone Receptor Signaling Promotes Cancer Associated Fibroblast Mediated Tumorigenicity in ER+ Breast Cancer // Endocrinology. –2024. – V. 165(9).
5. Hellberg S., Raffetseder J., Rundquist O., Magnusson R., Papapavlou G., Jenmalm M. C., Ernerudh J., Gustafsson M. Progesterone Dampens Immune Responses in In Vitro Activated CD4+ T Cells and Affects Genes Associated With Autoimmune Diseases That Improve During Pregnancy // Frontiers in Immunology. – 2021. – V. 12. – P.672168.
6. Xiao Y., Zheng P., Xu W., Wu Z., Zhang X., Wang R., Huang T., Ming J. Progesterone receptor impairs immune response and down-regulates sensitivity to anti-LAG3 in breast cancer // Translational Research. – 2024. – V.271. – P. 68–78.

УДК: 579.695; 546.18; 615.916'1

Белый фосфор и его мутагенные свойства

А.З. Миндубаев, Э.В. Бабынин

E-mail: mindubaev-az@yandex.ru

ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, Россия

Введение. Биodeградация иногда приводит к образованию не менее, а более токсичных веществ, так называемых «летальных метаболитов». Некоторые из них обладают генотоксичностью, приводящей к росту числа мутаций и возникновению онкологических заболеваний. Поэтому, исследование биodeградации ксенобиотиков должно сопровождаться тестированием на генотоксичность. В Токсикологическом профиле белого фосфора [1] сообщается об отсутствии генотоксичности данного вещества.

Материалы и методы. SOS-lux тест был выполнен, как описано в работе [2]. Для оценки цитогенетического действия фосфора на клетки эукариот использовали тест-систему *Allium cepa* [3].

Результаты. Оценка генотоксичности белого фосфора при помощи SOS-lux теста показала, что он проявляет мутагенные свойства. Р₄ в концентрации 62.5 мкг/мл является слабым мутагеном, по сравнению с пероксидом водорода. При более высоких концентрациях токсические свойства Р₄ преобладают над мутагенными. Р₄ в концентрации 1000 мкг/мл убивает культуру за 9 часов

эксперимента. Низкая ДНК повреждающая активность белого фосфора, показанная в представленной работе, по-видимому, связана исключительно с тем, что общая токсичность этого вещества намного выше. То есть, клетки в его присутствии погибают быстрее, чем наблюдается SOS ответ [4].

Важной задачей являлось исследование генотоксичности P_4 для клеток эукариот. Для этого использовали тест-систему с корешками репчатого лука *Allium cepa* (*Allium* тест). Установлено, что P_4 существенно снижает митотическую активность тканей по сравнению с контролем и, следовательно, обладает митотоксической активностью. Анализ соотношений фаз митоза показал увеличение доли клеток на стадии профазы с соответствующим уменьшением процентного отношения других стадий. Это может быть связано с блокировкой деления клеток в конце стадии профазы.

Заключение. Данные результаты получены нами впервые в мире, в более ранних работах генотоксичность у белого фосфора обнаружена не была. Они позволяют считать белый фосфор еще более опасным поллютантом, чем считалось до сих пор.

1. Toxicological profile for white phosphorus // U.S. Department of health and human services. USA. – 1997. – P. 248.
2. Cooper D.L., Lovett S.T. Toxicity and tolerance mechanisms for azidothymidine, a replication gap-promoting agent, in *Escherichia coli* // DNA Repair (Amst). – 2011. – V. 10. – P. 260–270.
3. Fiskesjo G. Allium test for screening chemical evaluation of cytological parameters / in Wang W., Gorsuch J.W., Hughes J.S. // Plants for Environmental Studies // 6005 J.S. (Eds), New York, NY: CRC Lewis Publishers. – 1997. – P. 307–333.
4. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Пискунов Д.Б., Махиянов А.Н., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Волошина А.Д. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2019. – V. 9. – P. 81 – 94. DOI: 10.21285/2227-2925-2019-9-1-81-94.

Электронное издание сетевого распространения

Сборник тезисов 3-й Всероссийской школы-конференции «Биохимия – основа наук о жизни», посвященной памяти профессора В.Г. Винтера

Подписано к использованию 25.02.2025
Научная библиотека им. Н.И.Лобачевского