МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС

БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

ВЫПУСК 19

26 - 29 ОКТЯБРЯ 2021
МОСКВА

INTERNATIONAL CONGRESS

BIOTECHNOLOGY: STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES

ISSUE 19

26 - 29 OCTOBER, 2021
MOSCOW

WWW.BIOMOS.RU

МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС «БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ»

Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития»
26 - 29 ОКТЯБРЯ 2021 г.

Настоящие материалы конгресса созданы на основании информации, предоставленной участниками форума и одобренные руководителями секций.

Материалы тезисов публикуются в авторской версии. Организаторы не несут ответственности за неточности и упущения в названиях и адресах, представленных в данном сборнике.
Любое копирование и использование материалов без письменного разрешения Программного комитета не разрешено.

УДК 575.1/2::612.017.1
ББК 28.072
ISBN 978-5-6045396-1-3
ISSN: 2312-640X
DOI: 10.37747/2312-640X-2021-19

© ООО “ЭКСПО-БИОХИМ-ТЕХНОЛОГИИ”
129090, Москва г, Олимпийский пр-кт, дом № 10, к.2, кв.154
info@biomos.ru, www.biomos.ru

Все права на издание принадлежат ООО “ЭКСПО-БИОХИМ-ТЕХНОЛОГИИ” – организатор международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития»

INTERNATIONAL CONGRESS «BIOTECHNOLOGY: STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES»

The proceedings of International congress «Biotechnology: state of the art and perspectives»
26 - 29 OCTOBER, 2021

DISCLAIMER
This book contains abstracts and complete papers approved by the Congress Review Committee. Authors are responsible for the content and accuracy.

Opinions expressed may not necessarily reflect the position of the Scientific Council of congress. Information in the «Biotechnology: state of the art and perspectives» 2021 Congress Proceedings is subject to change without notice. No part of this book may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, for any purpose, without the express written permission of the International Scientific Council of congress.

ISBN 978-5-6045396-1-3
ISSN: 2312-640X
DOI: 10.37747/2312-640X-2021-19

Copyright © LTD “EXPO-BIOHIM-TEXNOLOGIES”
apt. 154, bldg 10/2, Olimpiyskiy Pr-kt, Moscow,
info@biomos.ru www.biomos.ru

All Rights Reserved by
EXPO-BIOHIM-TEXNOLOGIES LTD –
organizer of the International congress «Biotechnology: state of the art and perspectives».

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENT

Организационный комитет / *Organizing Committee* ..... 3 / 4

Программный комитет / *Program Committee* ..... 5 / 7

МАТЕРИАЛЫ КОНГРЕССА

Геномная инженерия / *Genetic engineering*

1. Новое в создании молекулярных инструментов
редактирования ДНК и в конструировании регуляторных сетей /
New in designing molecular tools of DNA editing and regulatory network 9

Биотехнология и медицина / *Biotechnology and medicine*

2. Бактериофаги в биотехнологии, сельском хозяйстве и медицине /
Bacteriophages in biotechnology, medicine and agriculture 11

3. Биоматериалы нового поколения для медицины и промышленности /
New generation biomaterials for medicine and industry 14

4. Болезни головного мозга: 21 век - состояние и что нас ожидает /
Brain diseases in 21 century: state of the art and perspectives 47

5. Внеклеточные везикулы и циркулирующие микроРНК /
Extracellular vesicles and circulating microRNA 54

6. Лечение онкозаболеваний человека с помощью природных и рекомбинантных вирусов /
Natural and recombinant virus oncotherapy 62

7. Нанобиотехнологии в медицине / *Nanobiotecnology in medicine* 64

8. Новые физико-химические медико-биологические технологии: термогелиокс,
функциональная магнито-резонансная томография, суперкомпьютерные вычисления /
New physico-chemical médecine-biological technologies: thermoheliocs,
functional magnetic resonance tomography, supercomputering 109

9. Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение /
Digital biodesign and personalised healthcare 127

Биофарма / *Biopharmaceutics*

10. Биотехнология для профилактики и терапии инфекционных болезней.
Вакцины нового поколения, внедрение в практику здравоохранения /
Biotechnology for infectious disease prevention and treatment.
New generation vaccines, practical application in health care 160

11. Биотехнология производства лекарственных средств, вакцинных препаратов
и диагностических тест-систем против новой коронавирусной инфекции COVID-19 /
Biotechnology in pharmaceutical manufacturing, vaccines
and diagnostic test-system for new coronavirus infection COVID-19 177

12. Инновационные технологии и оборудование
для фармацевтической промышленности и медицины /
Innovation technologies and equipment for pharmaceutical industry and medicine 184

13. От клеточных технологий к персонализированной медицине /
From cell technologies to personalized medicine 192

Биоинформатика и IT / *Bioinformatics and IT*

14. Задачи биоинформатики в геномных исследованиях и разработке генетических
технологий для здравоохранения, сельского хозяйства и промышленности /
Bioinformatics tasks in gene researching and development of gene technologies
for health care, agriculture and manufacturing industry 197

Биоэкономика / *Bioeconomics*

15. Биоаналитические технологии:
Новые решения для применения в медицине и сельском хозяйстве /
Bioanalytic technologies in medicine and agriculture 215

16. Биокаталитические технологии / *Biocatalysis and technologies* 264

17. Биологическая трансформация загрязнений в окружающей среде:
закономерности и практические аспекты /
Biological transformations of contaminants in the natural environment: patterns and practical aspects 290

18. Генетические ресурсы и биотехнологические процессы
для пищевой и кормовой промышленности /
Genetic resources and biotechnology processes in food and feed industry 300

19. Генетические технологии в животноводстве:
от развития фундаментальной науки до практического использования /
Gene engineering in livestock: from fundamental studies to practical application 333

20. Микробиологические подходы в создании сельскохозяйственных культур
в растениеводстве с улучшенными хозяйственно-ценными признаками /
Mictobiology approach to crop development with economic characters in plant growing 360

21. О подготовке высококвалифицированных биотехнологических кадров,
в том числе, для генетических технологий /
Training of highly qualified specialists in biotechnology and gene engineering 370

22. Общий раздел / *Other* 375

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ

Евтушенков Владимир Петрович	Председатель Совета директоров АФК “Система”, Председатель Организационного комитета
Быков Валерий Алексеевич	Академик РАН, советник Президиума РАН, главный научный сотрудник Всероссийского института лекарственных растений, почетный председатель Организационного комитета
Арчаков Александр Иванович	Академик РАН, научный руководитель Института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Сопредседатель Оргкомитета
Алешников Владимир Евгеньевич	Руководитель конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» и Выставки «Мир биотехнологии-2020», ответственный секретарь Оргкомитета
Варфоломеев Сергей Дмитриевич	Член-корреспондент РАН, научный руководитель Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, председатель Программного комитета
Габибов Александр Габибович	Академик РАН, директор ИБХ РАН
Зиновьева Наталия Анатольевна	Академик РАН, директор ВИЖ им. Л.К. Эрнста
Иванов Виктор Петрович	Президент Российского союза химиков
Кирпичников Михаил Петрович	Академик РАН, член Президиума РАН, декан биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
Лисица Андрей Валерьевич	Академик РАН, профессор
Лисицын Андрей Борисович	Академик РАН, научный руководитель ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова
Меньшутина Наталия Васильевна	Профессор, д.т.н., директор Российско-Швейцарского учебно-научного центра трансфера фармацевтических биотехнологий, РХТУ имени Д.И. Менделеева
Мирошников Анатолий Иванович	Академик РАН, декан факультета Биотехнологии МГУ им. М.В. Ломоносова
Тихонович Игорь Анатольевич	Академик РАН, директор ВНИИСХМ, декан факультета биологии СПбГУ
Чехонин Владимир Павлович	Академик РАН, вице-президент РАН, руководитель отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии Государственного научного центра социальной и судебной психиатрии им. В. П. Сербского, заведующий кафедрой медицинских нанобиотехнологий Российского государственного медицинского университета
Цыганов Дмитрий Игоревич	Профессор, заместитель директора Департамента инноваций и перспективных исследований Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

ORGANIZING COMMITTEE

Vladimir P. Evtushenkov	Chairman of the Board, Non-executive Director, Chairman of the Strategy Committee JSFC Sistema
Valery A. Bykov	Academician of RAS, National Institute of Medicinal Plants, Chair of the Organizing Committee
Alexander I. Archakov	Academician of RAS, Academic adviser, Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Co-Chair of the Organizing Committee
Sergey D. Varfolomeyev	Corresponding Member of RAS, Research Head of Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, Chair of the Program Committee
Vladimir P. Chekhonin	Academician of RAS, vice-president of RAS, Co-Chair of the Program Committee
Vladimir Y. Aleshnikov	Executive Secretary of the Organizing Committee
Victor P. Ivanov	President, Russian Union of Chemists
Alexander A. Gabibov	Academician of RAS, Director of the IBCh RAS
Andrey V. Lisitsa	Academician of RAS, professor
Mikhail P. Kirpichnikov	Academician of RAS, Member of the Presidium of the RAS, Dean of Biology Department, Lomonosov Moscow State University
Andrey B. Lisitsyn	Academician of RAS, Academic adviser of Gorbatov FGBNU VNIIMP, Russian Academy of Agriculture
Natalia V. Menshutina	Professor, Director of International Training and Research Center for Transfer of Pharmaceutical Biotechnologies, Mendeleyev Russian University of Chemical Technologies
Anatoly I. Miroshnikov	Academician of RAS, Chair of the Academic Council of Pushino Research Center of RAS
Igor A. Tikhonovich	Academician of RAS, director of FGBNU National Research Institute of Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Dean of Biology Department of SPBU
Natalia A. Zinovieva	Academician of RAS, Director of L.K. Ernst National Research Institute of Animal Breeding
Dmitriy I. Tsyganov	Doctor of Science (Technology) professor, deputy head of Department of innovations and advanced studies, Ministry of Science and Higher Education

ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ

ВАРФОЛОМЕЕВ Сергей Дмитриевич	член-корреспондент РАН, научный руководитель Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, председатель Программного комитета
ЧЕХОНИН Владимир Павлович	академик РАН, вице-президент РАН, руководитель отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии Государственного научного центра социальной и судебной психиатрии им. В. П. Сербского, заведующий кафедрой медицинских нанобиотехнологий Российского государственного медицинского университета, сопредседатель Программного комитета
АЛЕШНИКОВ Владимир Евгеньевич	научный руководитель конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» и выставки «Мир биотехнологии-2021», ответственный секретарь Оргкомитета
АРЧАКОВ Александр Иванович	академик РАН, научный руководитель Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, сопредседатель Оргкомитета
ВАСИЛЬЕВ Андрей Валентинович	профессор, д.б.н., член-корреспондент РАН, директор Института Биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
ВЛАСОВ Валентин Викторович	академик РАН, д.х.н., научный руководитель Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск
ГРАДОВА Нина Борисовна	профессор, д.б.н., кафедра биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева
ДЗАНТИЕВ Борис Борисович	профессор, д.х.н., Институт биохимии им. А.Н. Баха
ЕГОРОВ Алексей Михайлович	академик РАН, профессор, заведующий лабораторией инженерной энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
ЗИНОВЬЕВА Наталия Анатольевна	академик РАН, директор ВИЖ им. Л.К. Эрнста
КИРПИЧНИКОВ Михаил Петрович	академик РАН, член Президиума РАН, декан биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
КЛЯЧКО Наталья Львовна	д.х.н., профессор, зам. зав. кафедрой химической энзимологии химического факультете МГУ им. М.В. Ломоносова, заместитель директора Научно-образовательного центра по нанотехнологиям МГУ
КОЛЧАНОВ Николай Александрович	академик РАН, профессор, д.б.н., научный руководитель Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск
КРАСИЛЬНИКОВ Игорь Викторович	д.б.н., профессор, заместитель директора по инновациям и международным отношениям ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, г. Санкт-Петербург
КУРОЧКИН Илья Николаевич	д.х.н., профессор, директор Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, председатель конкурса молодых ученых
ЛАГУНИН Алексей Александрович	д.б.н., профессор РАН, зав. кафедрой биоинформатики РНИМУ имени Н.И. Пирогова, в.н.с. ИБМХ
ЛЕГОНЬКОВА Ольга Александровна	д.т.н., зав. отделом перевязочных, шовных и полимерных материалов в хирургии ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В.Вишневского» Минздрава России

ЛИСИЦЫН **Андрей Борисович**	академик РАН, научный руководитель ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова
ЛУКЬЯНОВ **Сергей Анатольевич**	академик РАН, ректор РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России
МАЖУГА **Александр Георгиевич**	профессор РАН, ректор РХТУ имени Д.И. Менделеева
МАКЕЕВ **Владислав Юрьевич**	член-корреспондент РАН, д.ф.-м.н., зав. отделом ФБГНУ ИОГен РАН им. Н.И. Вавилова
МАРТЫНОВ **Александр Игоревич**	к.м.н., первый заместитель директора ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства РФ
МЕДВЕДЕВ **Вадим Викторович**	к.э.н., директор Департамента инноваций и перспективных исследований Министерства науки и высшего образования Российской Федерации
МЕНЬШУТИНА **Наталия Васильевна**	профессор, д.т.н., директор Российско-Швейцарского учебно-научного центра трансфера фармацевтических биотехнологий, РХТУ имени Д.И. Менделеева
МИРОШНИКОВ **Анатолий Иванович**	академик РАН, декан факультета Биотехнологии МГУ им. М.В.Ломоносова
НЕТЕСОВ **Сергей Викторович**	член-корреспондент РАН, профессор, д.б.н., зав. лабораторией биотехнологии и вирусологии, Новосибирский государственный университет
ОВЧИННИКОВА **Татьяна Владимировна**	д.х.н., профессор кафедры биотехнологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, руководитель Научно-образовательного центра Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, сопредседатель конкурса молодых ученых
ПАНФИЛОВ **Виктор Иванович**	профессор, д.т.н., зав. кафедрой биотехнологии, РХТУ имени Д.И. Менделеева
ПОПОВ **Владимир Олегович**	член-корр. РАН, научный руководитель Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
ПОРОЙКОВ **Владимир Васильевич**	профессор, д.б.н., заведующий отделом биоинформатики Институт биомедицинской химии им.В.Н. Ореховича
РИМАРЕВА **Любовь Вячеславовна**	академик РАН, д.т.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБНУ ВНИИПБТ
ТИТОВ **Евгений Иванович**	академик РАН, заведущий кафедрой Технологии и биотехнологии продуктов питания животного происхождения МГУПП
ТИХОНОВИЧ **Игорь Анатольевич**	академик РАН, директор ВНИИСХМ, декан факультета биологии СПбГУ
ХАМИТОВ **Равиль Авгатович**	д.м.н., профессор, генеральный директор ООО «МБЦ «Генериум»
ЦЫГАНОВ **Дмитрий Игоревич**	профессор, заместитель директора, Департамент инноваций и перспективных исследований Министерства науки и высшего образования Российской Федерации
ШЕСТИБРАТОВ **Константин Александрович**	к.б.н., руководитель группы лесной биотехнологии Филиала ИБХ, г. Пущино
ЯНЕНКО **Александр Степанович**	д.б.н., профессор, директор НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика, сопредседатель Программного комитета

PROGRAM COMMITTEE

Sergey D. VARFOLOMEYEV	Corresponding Member of RAS, Research Head of Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, Chair of the Program Committee
Vladimir P. CHEKHONIN	Academician of RAS, vice-president of RAS, Co-Chair of the Program Committee
Vladimir Y. ALESHNIKOV	Executive Secretary of the Organizing Committee
Alexander I. ARCHAKOV	Academician of RAS, Academic adviser, Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Co-Chair of the Organizing Committee
Nina B. GRADOVA	Professor, Grand PhD (Biology), sub-Department of Biotechnology, Mendeleyev Russian University of Chemical Technology
Boris B.DZANTIEV	Professor, A.N. Bach Institute of Biochemistry
Alexey M. YEGOROV	Academician of RAS, Professor, Head of Engineering Enzymology Laboratory, Chemical Department, Lomonosov Moscow State University
Ravil A. KHAMITOV	Professor, Doctor of Science (Medicine), General Director of Generium
Mikhail P. KIRPICHNIKOV	Academician of RAS, Member of the Presidium of the RAS, Dean of Biology Department, Lomonosov Moscow State University
Natalia L. KLYACHKO	Grand PhD (Chemistry), Professor, Head of Sub-Department of Chemical Enzimology of Chemistry Department, Moscow State University, deputy director of MSU Nanotechnology Education and Research Center
Nikolay A. KOLCHANOV	Academician of RAS, Director of FGBUN Institute of Cytology and Genetics, Siberian Section of RAS, Novosibirsk
Igor V. KRASILNIKOV	Grand PhD (Biology), Professor, Deputy Director for Innovations and International Relations, FGUP SPbNIIVS, Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg
Ilya N. KUROCHKIN	Grand PhD (Chemistry), Professor, Director of Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, Chair of Young Scientist Contest
Alexey A. LAGUNIN	Doctor od Science (Biology), professor of RAS, head of bioinformatics chair of RNRMU, leading research scientist IBMC
Olga A. LEGONKOVA	Grand PhD (Technology), Head of Laboratory, A.V. Vishnevsky Institute of Surgery FSHE, RF Ministry of Health
Andrey B. LISITSYN	Academician of RAS, Director of Gorbatov FGBNU VNIIMP
Sergey A. LUKYANOV	Academician of RAS, Rector of Pirogov Russian National Research Medical University
Alexander G. MAJOUGA	Professor of RAS, rector of Mendeleyev Russian University of Chemical Technologies
Vsevolod Y. MAKEEV	Corresponding Member of RAS, Doctor of Science (Physics and Mathematics) head of Division, N.I. Vavilov Institute of General Genetics of RAS

Alexander I. MARTYNOV	PhD (Medicine), First Deputy Director of FGBU Institute of Immunology State Research Center, Federal Agency for Medicine and Biology
Vadim V. MEDVEDEV	PhD (Economy), Head of Department of special programmes and development of state research centers and technopolises, Ministry of Education and Science of Russian Federation
Natalia V. MENSHUTINA	Professor, Director of International Training and Research Center for Transfer of Pharmaceutical Biotechnologies, Mendeleyev Russian University of Chemical Technologies
Anatoly I. MIROSHNIKOV	Academician of RAS, Chair of the Academic Council of Pushino Research Center of RAS
Sergey V. NETYOSOV	Corresponding Member of RAS, Pro-Rector for Research, Novosibirsk State University, Novosibirsk
Tatiana V. OVCHINNIKOVA	Professor, Biotechnology sub-Department, Sechenov First Moscow State Medical University, Head of Research and Education Center, Academicians Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bio-Organic Chemistry of RAS, Co-Chair of Young Researchers' Contest
Victor I. PANFILOV	Professor, Head of sub-Department of Biotechnology of Mendeleyev Russian University of Chemical Technology
Vladimir O. POPOV	Corresponding Member of RAS, Director of Bakh Institute of Biochemistry, RAS, Coordinator of Bioindustry and Bioresources BioTech-2030 Technological Platform
Vladimir V. POROYKOV	Professor, Head of Bioinformatics Section, Head of Laboratory of Structural and Functional Design of Pharmaceuticals, Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry
Lubov'. V. RIMAREVA	Academician of RAS, Grand PhD (Technical Science), professor, FGBNU VNIIPBT
Constantine A. SHESTIBRATOV	PhD (Biology), Forestry Biotechnology Team Lead, Pushino Branch of Institute of Bio-Organic Chemistry, Pushino
Yevgeny I. TITOV	Academician of RAS, Director, Institute of Applied Biotechnology
Igor A. TIKHONOVICH	Academician of RAS, director of FGBNU National Research Institute of Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Dean of Biology Department of SPBU
Dmitry I. TSYGANOV	Doctor of Science (Technology)professor, deputy head of Department of innovations and advanced studies, Ministry of Science and Higher Education
Andrey V. VASILIEV	Corresponding member of RAS, professor, Grand PhD (Biology), Director of Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences
Valentin V. VLASOV	Academician of RAS, Director of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Section of RAS, Novosibirsk
Natalia A. ZINOVYEVA	Academician of RAS, Director of Ernst FGBNU VIZh
Alexander S. YANENKO	Grand PhD (Biology), Professor, Director of FGUP GosNIIgenetica State Research Center, Co-Chair of the Program Committee

ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

GENETIC ENGINEERING

НОВОЕ В СОЗДАНИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНСТРУМЕНТОВ РЕДАКТИРОВАНИЯ ДНК

NEW IN DESIGNING MOLECULAR TOOLS OF DNA EDITING

1. ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ЭТИОТРОПНОЙ ТЕРАПИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ
Смирнихина С.А. 9

GENOME EDITING FOR THE DEVELOPMENT OF ETIOTROPIC THERAPY OF HEREDITARY DISEASES
Smirnikhina S.A. 10

УДК 615.038 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-9-10

ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ЭТИОТРОПНОЙ ТЕРАПИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Смирнихина С.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», г. Москва, Россия
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1
e-mail: smirnikhinas@gmail.com

Методы геномного редактирования можно использовать в качестве генной терапии при наследственных заболеваниях. Как минимум для семи из них уже проводятся клинические исследования, а несколько десятков препаратов находятся на доклиническом этапе исследования.

Ключевые слова: геномное редактирование, CRISPR-Cas9, муковисцидоз

Геномное редактирование – группа методов генной инженерии, в основе которых лежит использование программируемых нуклеаз. Эти методы позволяют создать двуцепочечный разрыв (ДЦР) ДНК в определенном месте (например, в области мутации, которая является причиной наследственного заболевания). Затем созданный ДЦР репарируется одним из двух клеточных механизмов репарации – негомологичным соединением концов (НГСК) или направленной гомологичной репарацией (НГР). Первый способ заключается в сшивании поврежденной цели ДНК и часто сопряжен с ошибками, что потенциально может быть использовано для перманентного повреждения гена и полного выключения его экспрессии. НГР – более точный механизм репарации, в основе которого лежит рекомбинация с донорной молекулой ДНК, которая способна заместить собой поврежденный фрагмент ДНК. Этот механизм позволяет исправлять мутации, которые ведут к заболеваниям. Наиболее известным и распространенным методом геномного редактирования является CRISPR-Cas9, за открытие которого в 2020 году его создатели Э. Шарпантье и Д. Дудна получили Нобелевскую премию по химии.

Сфера применения методов геномного редактирования довольно широка – от изучения функции разных генов до разработки генной терапии наследственных заболеваний. В настоящее время в мире

проводятся клинические исследования эффективности и безопасности геномного редактирования для таких заболеваний как гемофилия B, серповидно-клеточная анемия, β-талассемия, мукополисахаридозы I и II типов, врожденный амавроз Лебера 10 и наследственный транстиретиновый амилоидоз. На стадии доклинических исследований находятся препараты для лечения недостаточности альфа-1-антитрипсина, гликогеноза Ia типа, миодистрофии Дюшенна, муковисцидоза, болезни Штаргардта, синдрома Ушера и многих других.

Лаборатория редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ» разрабатывает генную терапию муковисцидоза с использованием CRISPR-Cas9. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки от больного муковисцидозом с гомозиготной мутацией F508del в гене *CFTR* были успешно редактированы разными комбинациями компонентов CRISPR-Cas9. Наилучшая эффективность коррекции мутации составила около 2,5% аллелей (5% клеток), что, с одной стороны, демонстрирует возможность исправления мутации этим методом, а с другой стороны, свидетельствует о необходимости проведения дополнительных исследований, направленных по повышение эффективности.

UDC 615.038 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-9-10

GENOME EDITING FOR THE DEVELOPMENT OF ETIOTROPIC THERAPY OF HEREDITARY DISEASES

Smirnikhina S.A.

Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Centre for Medical Genetics", Moscow, Russia
115522, Moscow, st. Moskvorechye, 1
e-mail: smirnikhinas@gmail.com

Genome editing techniques could be used as gene therapy for hereditary diseases. Clinical trials are already underway for at least seven of them, and several dozen drugs are at the preclinical stage of research.

Keywords: genome editing, CRISPR-Cas9, cystic fibrosis

Genome editing is a group of genetic engineering techniques based on the use of programmable nucleases. These methods can create a DNA double-strand break (DSB) at a desired locus (for example, in the area of a mutation that causes a hereditary disease). Then, the created DSB could be repaired by one of two cellular repair mechanisms - non-homologous end-joining (NHEJ) or homology-directed repair (HDR). The first method ligates the damaged DNA and is often fraught with errors, which can potentially be used to permanently damage the gene and completely turn off its expression. HDR is a more accurate repair mechanism, which is based on recombination with a donor DNA molecule, which is capable of replacing the damaged DNA fragment. This mechanism makes it possible to correct mutations that lead to diseases. CRISPR-Cas9 is the most famous and widespread genome editing method; its creators E. Charpentier and D. Doudna received the Nobel Prize in Chemistry in 2020 for the its discovery.

The scope of application of genome editing methods is quite wide - from studying the function of different genes to developing gene therapy for hereditary diseases. Currently, clinical trials of the efficacy and safety of genome editing for diseases such as hemophilia B, sickle cell anemia, β-thalassemia, mucopolysaccharidosis types I and II, Leber congenital amaurosis 10 and hereditary transthyretin amyloidosis are being carried out worldwide. Several dozen of drugs for the treatment of alpha-1 antitrypsin deficiency, glycogen storage disease type Ia, Duchenne muscular dystrophy, cystic fibrosis, Stargardt disease, Usher syndrome and many others are at the stage of preclinical studies.

The Laboratory of Genome Editing of the Research Centre for Medical Genetics is developing gene therapy for cystic fibrosis using CRISPR-Cas9 method. Induced pluripotent stem cells from a cystic fibrosis patient with a homozygous F508del mutation in the *CFTR* gene were successfully edited with different combinations of CRISPR-Cas9 components. The best efficiency of mutation correction was about 2.5% of alleles (5% of cells), which, on the one hand, demonstrates the possibility of correcting the mutation by this method, and on the other hand, indicates the need for additional studies aimed at increasing efficiency.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

БАКТЕРИОФАГИ В БИОТЕХНОЛОГИИ, СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ И МЕДИЦИНЕ

BACTERIOPHAGES IN BIOTECHNOLOGY, MEDICINE AND AGRICULTURE

1. МОНИТОРИНГ ФАГОВ LACTOCOCCUS LACTIS МЕТОДОМ МАССИВНОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ
Бектуганова А., Алексюк М.С., Анаркулова Э.И., Аманбаева М., Богоявленский А.П., Березин В.Е. 11

1. LACTOCOCCUS LACTIS PHAGE MONITORING BY MASSIVE PARALLEL SEQUENCING
Bektuganova A., Alexuyk M.S., Anarkulova E.I., Amanbayeva M.B., Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E. 12

УДК 582.284:543.061 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-11-13

МОНИТОРИНГ ФАГОВ LACTOCOCCUS LACTIS МЕТОДОМ МАССИВНОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Бектуганова А., Алексюк М.С., Анаркулова Э.И., Аманбаева М., Богоявленский А.П., Березин В.Е.

КазНПУ им. Абая,
ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан
050010, Алматы, Богенбай батыра, 105
virprot@mail.ru

Мониторинг наличия фагов молочнокислых бактерий в образцах молока проводился с использованием технологии массивного параллельного секвенирования. Установлено наличие нескольких групп фагов, что показывает перспективность метода для идентификации фагов в молочной продукции.

Ключевые слова: Lactococcus lactis, фаг, молоко, массивное-параллельное секвенирование

Несмотря на стратегии, разработанные для борьбы с фагами, эта биотехнологическая проблема по-прежнему остается наиболее частой причиной медленной или неполной ферментации молока. Биоразнообразие и эволюция популяций фагов частично ответственны за сложность контроля над ними. Фаги попадают в молоко уже на стадии доения и на момент поставки молока на производственные мощности в 1мл продукта может содержаться до миллиона фаговых частиц, что увеличивает затраты на производство молочнокислых продуктов из-за увеличения объемов заквасок [1]. На сегодняшний день в международной базе NCBI содержится информация о полных геномах 568 фагов, способных лизировать Lactococcus lactis. Разнообразие фагов относящихся к 10 различным генетическим группам, принадлежащих к разным семействам усложняет молекулярные методы диагностики наличия вирусов. Кроме того разнообразие вирусов в значительной степени зависит от географического расположения ферм, что иногда препятствует использованию зарубежных тест-систем.

В наших исследованиях проводилось метагеномное исследование разнообразия фагов Lactococcus lactis в образцах молока, приобретенных на рынке г. Алматы, Казахстан.

Изоляцию нуклеиновых кислот проводили с использованием набора PureLink® (Ambion. ThermoScientific, США) и подготовку ДНК-библиотек проводили с использованием набора Nextera XT DNA

Sample Preparation Kit (Illumina, США) в соответствии с инструкцией. Анализ качества геномных библиотек проводили при помощи прибора Agilent 2100 с использованием набора Agilent DNA 1000 Kit.

Полученные библиотеки были секвенированы с использованием платформы Illumina MiSeq (Сан-Диего, Калифорния, США) и набора MiSeq Kit v3, позволяющих получать парноконцевые чтения длиной 300 п.н.

Анализ полученных данных проводили с помощью программ Kaiju[2].

В ходе исследований было показано, что, несмотря на то, что 70% фагов молочнокислых бактерий относятся к 3 основным группам, наличие вирусов ими не ограничивается. В наших исследованиях было показано, что в Казахстане не выявляются фаги группы C2. Однако было установлено наличие 8 групп из 12 известных, включая стандартные 936 и 335 [3].

Этот факт свидетельствует о том, что выявление с помощью ПЦР трех основных групп фагов является недостаточным и требует дополнительных исследований разнообразия вирусов того или иного географического региона методом массивного параллельного секвенирования.

Литература

1. *del Rio B, Binetti AG, Martín MC, Fernández M, Magadán AH, Alvarez MA. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. Food Microbiol. 2007. - 24(1):75-81. doi: 10.1016/j.fm.2006.03.001.*
2. *Menzel, P., Ng, K. & Krogh, A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. Nat Commun 2016. – Vol.7, 11257, https://doi.org/10.1038/ncomms11257*
3. *Verreault D., Gendron L., Rousseau G.M., Veillette M., Massé D., Lindsley W.G., Moineau S., Duchaine C. Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants // Appl Environ Microbiol. 2011. – Vol. 77(2). – P.491-7. doi: 10.1128/AEM.01391-10.*

UDK 582.284:543.061 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-11-13

LACTOCOCCUS LACTIS PHAGE MONITORING BY MASSIVE PARALLEL SEQUENCING

Bektuganova A., Alexuyk M.S., Anarkulova E.I., Amanbayeva M.B., Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E.

Abai Kazakh National Pedagogical University,
Research and Production Center for microbiology and virology, Almaty, Kazakhstan
050010, Almaty, Bogenbay batyr. Str., 105
virprot@mail.ru

Monitoring of the presence of lactic acid bacteria phages in milk samples carried out using massive parallel sequencing technology. The presence of several groups of phages was identified, which shows that the method is promising for identifying phages in dairy products.

Keywords: Lactococcus lactis, phage, milk, massive-parallel sequencing.

Introduction. In spite of the developed strategies for phage control, this problem biotechnology remains the most common cause of a slow or incomplete fermentation of milk. The biodiversity and evolution of phage populations is partly responsible for the difficulty of controlling them. Phages enter milk already at the milking stage, and at the time of delivery of milk to production facilities, 1 ml of the product can contain up to a million phage particles, which increases the cost of producing lactic acid products due to an increase in the volume of starter cultures [1]. To date, NCBI database contains information on the complete genomes of 568 phages that can lyse Lactococcus lactis. The variety of phages of 10 different genetic groups, belonging to different families, complicates molecular methods for diagnosing the presence of viruses. In addition, the variety of viruses depends largely on the geographic location of farms, which sometimes hinders the use of foreign test systems.

In our studies, a metagenomic study of the diversity of Lactococcus lactis phages in milk samples purchased from the market of Almaty, Kazakhstan was carried out.

Isolation of nucleic acids performed using a PureLink® kit (Invitrogen, USA), and DNA libraries were prepared using a Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina, USA) in accordance with the instructions. Analysis of the quality of genomic libraries performed using an Agilent 2100 instrument using the Agilent DNA 1000 Kit.

The obtained libraries were sequenced using the Illumina MiSeq platform (San Diego, California, USA) and MiSeq Kit v3, which allows to obtain 300 bp pairwise reads.

The analysis of the obtained data was carried out using the Kaiju software [2].

As a result of the research, it was shown that despite the fact that 70% of lactic acid bacteria phages belong to 3 main groups, the presence of viruses is not limited to them. In our studies, it was shown that phages of the C2 group are not detected in Kazakhstan. However, it was found that there are 8 groups out of 12 known, including the standard 936 and 335 [3].

This fact indicates that PCR detection of three main groups of phages is insufficient and requires additional studies of the diversity of viruses in a particular geographic region using massive parallel sequencing.

References

1. *del Rio B, Binetti AG, Martín MC, Fernández M, Magadán AH, Alvarez MA. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. Food Microbiol. 2007. - 24(1):75-81. doi: 10.1016/j.fm.2006.03.001.*
2. *Menzel, P., Ng, K. & Krogh, A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. Nat Commun 2016. – Vol.7, 11257, https://doi.org/10.1038/ncomms11257*
3. *Verreault D., Gendron L., Rousseau G.M., Veillette M., Massé D., Lindsley W.G., Moineau S., Duchaine C. Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants // Appl Environ Microbiol. 2011. – Vol. 77(2). – P.491-7. doi: 10.1128/AEM.01391-10.*

БИОМАТЕРИАЛЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ И ПРОМЫШЛЕННОСТИ

NEW GENERATION BIOMATERIALS FOR MEDICINE AND INDUSTRY

1. НЕОБЫЧНАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ АМИНОКИСЛОТ И СОЛЕЙ СЕРЕБРА: ОТ САМООРГАНИЗАЦИИ ДО ПЕРСПЕКТИВ ПРИМЕНЕНИЯ
Аверкин Д.В., Вишневецкий Д.В., Мехтиев А.Р., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. 16

AN UNUSUAL SYSTEM BASED ON SULFUR-CONTAINING AMINO ACIDS AND SILVER SALTS: FROM SELF-ORGANIZATION TO APPLICATION PROSPECTS
D.V. Averkin, D.V. Vishnevetskii, A.R. Mekhtiev, S.D. Khizhnyak, P.M. Pakhomov 17

2. ИМПЛАНТИРУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕКТИНОВ ДЛЯ БИОИНЖЕНЕРНОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ
Белоусов А.С., Швед Н.А., Кузякова О.Ю., Виткалова А.В., Ковалев В.В., Малыкин Г.В., Дюйзен И.В. Кумейко В.В. 18

IMPLANTED MATERIALS BASED ON MODIFIED PECTINS FOR BIOENGINEERING NERVE TISSUE RECONSTRUCTION
A.S. Belousov, N.A. Shved, O.Yu. Kuzyakova, A.V. Vitkalova, V.V. Kovalev, G.V. Malykin, I.V. Dyuizen, V.V. Kumeiko 19

3. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОРЕЗОРБИРУЕМЫХ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА, ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА И ТРИКАЛЬЦИЙФОСФАТА
Булыгина И.Н., Зимина А.И., Жукова П.А., Сенатов Ф.С. 20

INVESTIGATION OF BIORESORBABLE COMPOSITE MATERIALS BASED ON POLYLACTIDE, POLYHYDROXYBUTYRATE AND TRICALCIUM PHOSPHATE
I.N. Bulygina, A.I. Zimina, P.A. Zhukova, F.S. Senatov 21

4. БИОАКТИВНЫЙ БИОПРАСТИЧНЫЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ ИОННО-ТРЕКОВЫХ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ И НАНО-КАРКАСА ХИТОЗАНА
Виноградов И.И., Нечаев А.Н., Еремин П.С., Гильмутдинова И.Р. 22

BIOACTIVE BIOPLASTIC MATERIAL BASED ON ION-TRACK WOUND COATINGS AND CHITOSAN NANO-SCAFFOLD
I. Vinogradov, A. Nechaev, P. Eremin, I. Gilmutdinova 23

5. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И CeO_2.
Девятаева А.А., Ревин В.В., Русяева В.В., Старостина О.И. 26

RESEARCH OF PHYSICAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF COMPOSITE MATERIALS BASED ON BACTERIAL CELLULOSE AND CeO_2.
Devyataeva A.A., Revin V.V., Rusyaeva V.V., Starostina O.I. 26

6. БИОПОЛИМЕРНЫЕ АНТИСЕПТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ
Владимирова А.В. 24

BIOPOLYMER ANTISEPTIC SYSTEMS BASED ON POLYHYDROXYALKANOATES FOR SOFT TISSUE RECONSTRUCTIVE TECHNOLOGIES
A.Vladimirova 25

7. ЭФФЕКТ ПАМЯТИ ФОРМЫ И ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ПОЛИМЕРНЫХ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА ДЛЯ АДАПТИВНЫХ МЕДИЦИНСКИХ КОНСТРУКЦИЙ
Жукова П.А., Сенатов Ф.С., Сурменев Р.А., Парий И.О. 27

SHAPE MEMORY EFFECT AND PIEZOELECTRIC EFFECT OF POLYMER COMPOSITE MATERIALS BASED ON POLYLACTIDE FOR ADAPTIVE MEDICAL STRUCTURES
P.A. Zhukova, F.S. Senatov, R.A. Surmenev, I.O. Pariy 28

8. АНТИМИКРОБНОЕ ПЛЕНОЧНОЕ ПОКРЫТИЕ НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТАТИВНО СИНТЕЗИРОВАННОГО ПОЛИАНИЛИНА, ДОПИРОВАННОГО ИОНАМИ МЕДИ
Васильева И.В., Хлупова М.Е., Шумакович Г.П., Зайцева Е.А., Громова Е.В., Морозова О.В. 29

ANTIMICROBIAL FILM COATING BASED ON ENZYMATICALLY SYNTHESIZED POLYANILINE DOPED WITH COPPER IONS
I.S. Vasil'eva, M.E. Khlupova, G.P. Shumakovich, E.A. Zaitseva, E.V. Gromova, O.V. Morozova.....30

9. ПОЛИМЕРНЫЙ КОМПОЗИЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ КОСТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ С ВОЗМОЖНОСТЬЮ ИНТРАОПЕРАЦИОНОЙ КОРРЕКЦИИ ФОРМЫ
Зимина А.И., Сенатов Ф.С., Струкова Н.В., Кривозубов М.С., Генералова М.С., Никитин К.Е., Орлова П.А., Грунина Т.М., Попонова М.С., Лунин В.Г., Карягина А.С. 31

POLYMERIC COMPOSITE MATERIAL FOR BONE IMPLANTS WITH THE FEASIBILITY OF INTRAOPERATIVE FORM CORRECTION
A.I. Zimina, F.S. Senatov, N.V. Strukova, M.S. Krivozubov, M.S. Generalova, K.E. Nikitin, P.A. Orlova, T.M. Grunina, M.S. Poponova, V.G. Lunin, A.S. Karyagina 32

10. МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ И КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО КАРКАСА ИЗ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА КАК ОСНОВЫ РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ
Кондратенко А.А., Калюжная Л.И., Соколова М.О., Чернов В.Е. 33

MICROSCOPIC ANALYSIS OF THE STRUCTURE AND COMPONENT COMPOSITION OF THE HUMAN UMBILICAL CORD TISSUE ENGINEERING SCAFFOLD AS THE BASIS OF WOUND COATING
A.A. Kondratenko, L.I. Kalyuzhnaya, M.O. Sokolova, V.E. Chernov 34

11. МОДИФИКАЦИЯ ТВЕРДОФАЗНОГО МЕТОДА СИНТЕЗА ДИОПСИДА МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ ИЗ МАТЕРИАЛОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ
Плахотнюк Е.Д., Сенатов Ф.С., Чоудхари Р., Колесников Е.А. 35

MODIFICATION OF THE SOLID-PHASE METHOD FOR THE SYNTHESIS OF MEDICAL DIOPSIDE FROM MATERIALS OF BIOLOGICAL ORIGIN
E.D. Plakhotnyuk, F.S. Senatov, R. Choudhary, E.A. Kolesnikov 35

12. ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИОННО-ТРЕКОВЫХ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭФИРОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИСКУССТВЕННОЙ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ
Серпионов Г.В., Петрова Д.В., Кошлань И.В., Нечаев А.Н. 36

THE POSSIBILITY OF USING ION-TRACK MATRICES BASED ON POLYESTERS TO CREATE ARTIFICIAL CONNECTIVE TISSUE
G.V. Serpionov, D.V. Petrova, I.V. Koshlan, A.N. Nechaev 37

13. НОВЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ МАГНЕТИТА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ
Таранова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. 38

NEW COMPOSITE MAGNETITE NANOPARTICLES FOR USE IN IMMUNOCHROMATOGRAPHIC
N.A. Taranova, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev 39

14. БИОКОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМИ И ГЕМОСТАТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ
Упыркина Е.С., Корякова К.А., Батайкина В.А., Маврина А.С., Лияськина А.Ю., Тюшева А.Э., Ревин В.В. 40

BIOCOMPOSITE MATERIALS WITH ANTIBACTERIAL AND HEMOSTATIC PROPERTIES BASED ON BACTERIAL CELLULOSE
E.S. Upyrkina, K.A. Koryakova, V.A. Bataykina, A.S. Mavrina, A.Y. Liyaskina, A.E. Tyusheva, V.V. Revin 41

15. МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ПМО ТЕТРАЦИКЛИНА – СИНТЕЗ И ПРИМЕНЕНИЕ В ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СЕНСОРАХ
Бизина Е.В., Фарафонова О.В., Ермолаева Т.Н. 42

MAGNETIC MIP TETRACYCLINE NANOPARTICLES - SYNTHESIS AND APPLICATION IN PIEZOELECTRIC SENSORS
E.V. Bizina, O.V. Farafonova, T.N. Ermolaeva.....43

16. БИОМИМЕТИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ХИРУРГИИ
Чубрик А.В., Сенатов Ф.С. 44

BIOMIMETIC MATERIALS BASED ON POLYHYDROXYBUTYRATE FOR RECONSTRUCTIVE SURGERY
A.V. Chubrik, F.S. Senatov 45

УДК 544.147.3 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-16-18

НЕОБЫЧНАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ АМИНОКИСЛОТ И СОЛЕЙ СЕРЕБРА: ОТ САМООРГАНИЗАЦИИ ДО ПЕРСПЕКТИВ ПРИМЕНЕНИЯ

Аверкин Д.В.[1,2,3], **Вишневецкий Д.В.**[1,3], **Мехтиев А.Р.**[3], **Хижняк С.Д.**[1], **Пахомов П.М.**[1]

[1] *Тверской Государственный Университет, 170100, Россия, Тверь, ул. Желябова, 33;*
[2] *Всероссийский научно-исследовательский институт физико-технических и радиотехнических измерений, 141570, Россия, Московская область, Солнечногорский район, г.п. Менделеево;*
[3] *Институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича, 119121, Россия, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.*
email: averkindmitry@gmail.com

Получены обратимые гидрогели, содержащие в своем объеме стабилизированные аминокислотой L-цистеином наночастицы серебра. Соль серебра, инициирующая гелеобразование – нитрит, нитрат и ацетат – влияет на биоактивные свойства конечного материала и различные возможности его модификации.

Ключевые слова: серосодержащие аминокислоты, наночастицы серебра, гидрогель, самосборка, цитотоксичность, цитостатики, фотокаталитическая активность.

Исследования в области молекулярной самосборки продолжают притягивать внимание ученых со всего мира. Это связано с многообразием возможных структур, формирующихся при самоорганизации, и как следствие различными свойствами конечных материалов. Изучением одной из необычных систем на основе водных растворов серосодержащих аминокислот и солей серебра (САС) занимается коллектив авторов ТвГУи ИБМХ. Интерес к данной системе заключается в том, что аминокислота способна выступать одновременно в роли восстанавливающего, стабилизирующего и гелеобразующего агента. Конечный материал – это обратимый гидрогель, в матрице которого равномерно распределены стабилизированные аминокислотой наночастицы серебра (НЧС). При этом, химическая природа аминокислоты и соли серебра существенно влияет на биоактивные свойства конечного материала и различные возможности его модификации. Здесь мы докладываем о четырех наиболее интересных результатах, полученных за последние три года, связанных с данной системой.

Во-первых, было показано, что введение в САС различных водорастворимых биосовместимых полимеров, таких как поливиниловый спирт, полиэтиленгликоль и поливинилпирролидон позволяет получать обратимые гели и макропористые пленки на их основе [1]. При этом химическая природа полимера и его концентрация оказывает влияние на регулярность распределения и размеры пор. Удалось синтезировать набухающую в воде, эластичную, пористую пленку с равномерным распределением НЧС, на основе САС и поливинилового спирта [2].

Во-вторых, были исследованы особенности самосборки и биоактивные свойства в водных системах на основе L-цистеина (ЦИС) и различных солей серебра – нитрита, нитрата и ацетата. Выяснено, что химическая природа соли серебра сильно влияет на размеры формирующихся агрегатов и величину их поверхностного заряда. Это в свою очередь определяет конечные свойства систем – цитостатическую активность по отношению к опухолевым клеткам человека и цитотоксичность к фибробластам в культуре [3].

В-третьих, оказалось, что замена ЦИС на N-ацетил-L-цистеин (АЦЦ) дает возможность практически полностью изменить механизм самосборки и в итоге управлять антибактериальными и противораковыми свойствами конечных систем.

Наконец, была синтезирована новая композитная система на основе САС и соли молибдена. Новый материал показал наличие высокой фотокаталитической активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственной поддержки создания и развития исследовательских центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» № 075-15-2020-913 и гранта РНФ № 21-73-00134

Литература

1. *D.V. Vishnevetskii, A.N. Adamyan, V.S. Laguseva, A.I. Ivanova, S.D. Khizhnyak, P.M. Pakhomov, Polym. Sci., Ser. A, 2019, 61, 96–104.*
2. *D.V. Vishnevetskii, A.I. Ivanova, S.D. Khizhnyak, P.M. Pakhomov, Fibre Chem., 2021, 53, 5-10.*
3. *D.V. Vishnevetskii, A.R. Mekhtiev, T.V. Perevozova, D.V. Averkin, A.I. Ivanova, S.D. Khizhnyak and P.M. Pakhomov, Soft Matter, 2020, 16, 9669-9673.*

UDC 544.147.3 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-16-18

AN UNUSUAL SYSTEM BASED ON SULFUR-CONTAINING AMINO ACIDS AND SILVER SALTS: FROM SELF-ORGANIZATION TO APPLICATION PROSPECTS

D.V. Averkin[1,2,3], D.V. Vishnevetskii[1,3], A. R. Mekhtiev[3], S.D. Khizhnyak[1], P.M. Pakhomov[1]

[1] Tver State University, 170100, Russia, Tver, 33 Zhelyabova street;
[2] Russian metrological institute of technical physics and radio engineering, 141570, Moscow region, Solnechnogorsky district, Mendeleevo;
[3] Institute of Biomedical Chemistry, 119121, Russia, Moscow, 10 Pogodinskaya street.
email:averkindmitry@gmail.com

Reversible hydrogels containing silver nanoparticles stabilized by the amino acid L-cysteine in their volume were obtained. The silver salt that initiates gelation - nitrite, nitrate and acetate - affects the bioactive properties of the final material and various possibilities for its modification.

Keywords: sulfur-containing amino acids, silver nanoparticles, hydrogel, self-assembly, cytotoxicity, cytostatics, photocatalytic activity.

Research in the field of the molecular self-assembly keep attracting the attention of scientists due to the variety of possible structures formed during self-organization, and as a result, different properties of the final materials. The study of one of the unusual systems based on aqueous solutions of sulfur-containing amino acids and silver salts (SAS) is carried out by a team of authors of TvSU and IBMC. The interest to this system lies in the fact that the amino acid is able to act simultaneously as a reducing, stabilizing and gel-forming agent. The final material is a reversible hydrogel, in the matrix of which silver nanoparticles (AgNPs) stabilized by the amino acid are evenly distributed. At the same time, the chemical nature of the amino acid and silver salt significantly affects the bioactive properties of the final material and different possibilities for its modification. Here we report the four most interesting results obtained over the past three years connected with this system.

At first, it was shown that the introduction of various water-soluble biocompatible polymers, such as polyvinyl alcohol, polyethylene glycol and polyvinylpyrrolidone, allows to obtain reversible gels and macroporous films based on them [1]. Herewith, the chemical nature of the polymer and its concentration influence on the regularity of the distribution and the size of the pores. It was possible to synthesize an elastic, porous film that swells in water with a uniform distribution of AgNPs, based on SAS and polyvinyl alcohol [2].

Secondly, the peculiarities of the self-assembly and bioactive properties in water systems based on L – cysteine (CYS) and various silver salts - nitrite, nitrate and acetate were studied. It was found out the chemical nature of the silver salt strongly affects the size of the forming aggregates and the value of their surface charge. This, in turn, determines the final properties of the systems – cytostatic activity against human tumor cells and cytotoxicity to fibroblasts in culture [3].

Thirdly, it turned out that the replacement of CYS with N-acetyl-L-cysteine (NAC) makes it possible to almost completely change the self-assembly mechanism and, as a result, control the antibacterial and anti-cancer properties of the final systems.

Finally, a new composite system based on SAS and molybdenum salt was synthesized. The new material showed the presence of the high photocatalytic activity.

The work was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of state support for the creation and development of world-class research centers "Digital Biodesign and personalized Healthcare" № 075-15-2020-913 and the grant of the Russian Science Foundation № 21-73-00134.

References

1. *D.V. Vishnevetskii, A.N. Adamyan, V.S. Laguseva, A.I. Ivanova, S.D. Khizhnyak, P.M. Pakhomov, Polym. Sci., Ser. A, 2019, 61, 96–104.*
2. *D.V. Vishnevetskii, A.I. Ivanova, S.D. Khizhnyak, P.M. Pakhomov,Fibre Chem., 2021, 53, 5-10.*
3. *D.V. Vishnevetskii, A.R. Mekhtiev, T.V. Perevozova, D.V. Averkin, A.I. Ivanova, S.D. Khizhnyak and P.M. Pakhomov, Soft Matter, 2020, 16, 9669-9673.*

УДК 57.085.23 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-18-20

ИМПЛАНТИРУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕКТИНОВ ДЛЯ БИОИНЖЕНЕРНОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ

Белоусов А.С.[1], **Швед Н.А.**[1,2], **Кузякова О.Ю.**[1], **Виткалова А.В.**[2], **Ковалев В.В.**[2], **Малыкин Г.В.**[2], **Дюйзен И.В.**[2], **Кумейко В.В.**[1,2]

[1] *Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет», Россия, г. Владивосток*
[2] *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского" Дальневосточного отделения Российской академии наук, Россия, 690922, Приморский край, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10,*
andrei-belousov@mail.ru

Исследованы структура и свойства имплантируемых материалов на основе модифицированных пектинов и показан предполагаемый механизм их действия на клетки нервной ткани.

Ключевые слова: биосовместимый материал, внеклеточный матрикс, наномеханические свойства, стволовые клетки.

В настоящее время рост числа злокачественных новообразований является одной из наиболее важных проблем здравоохранения во всем мире. К группе наиболее опасных опухолей находятся новообразования головного мозга из-за их значительного влияния на жизнь пациента в физическом, психологическом и неврологическом аспектах.

Традиционный подход к лечению глиобластомы фокусируется только на опухолевых клетках, игнорируя их неклеточную среду. Однако было доказано, что ключевую роль в развитии и прогрессировании опухоли играют не сами опухолевые клетки, а внеклеточный матрикс и ниша опухолевых стволовых клеток, которую он образует [2].

Научным сообществом признана необходимость создания имплантируемого материала, который будет максимально имитировать биомеханические свойства нативной ткани, контролировать судьбу контактирующих с ним клеток предотвращать их неконтролируемое деление [3].

В нашей исследовательской группе разработана базовая композиция оригинальных имплантируемых матриксных материалов на основе модифицированных биополимеров [1], которые могут быть использованы как в форме тонких гидрогелевых подложек для поверхностного культивирования, так и толстых гелей для трёхмерного культивирования клеток в толще материала.

Установлено, что матриксные материалы на основе разных пектинов отличаются и имеют наномеханические свойства, близкие к нативному мозгу или опухолевой ткани, в зависимости от применённого углеводного компонента.

В модели in vitro при поверхностном культивировании матриксные материалы на основе модифицированных пектинов с индексами ингибируют пролиферацию клеток глиомы C6, нейробластомы N2a и нервных стволовых клеток за счёт ингибирования сигнального пути Ras-Raf-MEK-ERK.

Образцы исследуемого материала были имплантированы крысам линии Wistar для оценки биосовместимости и биодеградации. Гистологическое исследование тканей и биохимический анализ крови показал, что матриксные материалы на основе модифицированных пектинов слабо иммуногенны, при не вызывают воспаление и гиперответ тканевых макрофагов; не оказывают локального и системного токсического воздействия на лабораторных животных.

Разработанные нами материалы в перспективе могут быть использованы для имплантации в область резекции опухоли мозга. При этом даже без добавления лекарственного препарата наши материалы обладают способностью замедлять пролиферацию контактирующих с ними опухолевых клеток. Такой подход является перспективным, поскольку на сегодняшний день не существует материалов с оптимальным набором подобных свойств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (модификация полисахаридов – проект № 121082600034-5, получение материалов и исследование их свойств – проект № 0657-2020-0004).

Литература

1. *Щеблыкина А.В., Мищенко П.В., Кумейко В.В. Биосовместимые деградируемые материалы на основе пектинов для тканевой инженерии: местная реакция тканей при подкожной имплантации // Тихоокеанский медицинский журнал. 2013. № 2 (52).*
2. *Ng J.C.H. [и др.]. Effects of surgery on neurocognitive function in patients with glioma: a meta-analysis of immediate post-operative and long-term follow-up neurocognitive outcomes // Journal of Neuro-Oncology. 2019. № 1 (141). С. 167–182.*
3. *Saito H. [и др.]. Evaluation of a Poly (Lactic-Co-Glycolic) Acid–Coated β-Tricalcium Phosphate Bone Substitute for Alveolar Ridge Preservation: Case Series // Clinical Advances in Periodontics. 2017. № 4 (7). С. 190–194.*

UDK 57.085.23 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-18-20

IMPLANTED MATERIALS BASED ON MODIFIED PECTINS FOR BIOENGINEERING NERVE TISSUE RECONSTRUCTION

A.S. Belousov[1], **N.A. Shved**[1,2], **O.Yu. Kuzyakova**[1], **A.V.Vitkalova**[2], **V.V. Kovalev**[2], **G.V. Malykin**[2], **I.V. Dyuizen**[2], **V.V. Kumeiko**[1,2]

1 Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Far Eastern Federal University", Vladivostok, Russia.
2 A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, 10, Ajax, Russky Island, Vladivostok, Primorsky Region, 690922, Russia
andrei-belousov@mail.ru

The structure and properties of implanted materials based on modified pectins have been investigated, and the proposed mechanism of their action on the cells of the nervous tissue has been shown.

Key words: biocompatible material, extracellular matrix, nanomechanical properties, stem cells.

Currently, the increase in the number of malignant neoplasms is one of the most important public health problems worldwide. Neoplasms of the brain belong to the group of the most dangerous tumors because of their significant influence on the patient's life in the physical, psychological and neurological aspects.

Standard treatment for malignant neoplasms of the brain includes imaging of the tumor, its surgical resection, and accompanied by therapeutic treatment.

Thus, the traditional approach to the treatment of glioblastoma focuses only on tumor cells, ignoring their non-cellular environment. However, it was proved that the key role in the development and progression of the tumor is played not by the tumor cells themselves, but by the extracellular matrix and the niche of tumor stem cells that it forms [2].

The scientific community has recognized the need to create an implantable material that will maximally imitate the biomechanical properties of native tissue, control the fate of cells in contact with it, and prevent their uncontrolled division [3].

Our research group has developed a basic composition of original implantable matrix materials based on modified biopolymers [1], which can be used both in the form of thin hydrogel substrates for surface cultivation and thick gels for three-dimensional cultivation of cells in the thickness of the material.

We found that matrix materials based on different pectins differ and have nanomechanical properties similar to native brain or tumor tissue, depending on the carbohydrate component used.

During surface cultivation in an in vitro model, matrix materials based on modified pectins with indices inhibit the proliferation of C6 glioma cells, N2a neuroblastoma and neural stem cells by inhibiting the Ras-Raf-MEK-ERK signaling pathway.

Samples were implanted in Wistar rats to assess biocompatibility and biodegradation. Histological examination of tissues and biochemical analysis of blood showed that matrix materials based on modified pectins are weakly immunogenic and do not cause inflammation and hyper-response of tissue macrophages; do not have local and systemic toxic effects on laboratory animals.

The materials developed by us in the future can be used for implantation in the resection area of a brain. Moreover, even without the addition of a drug, our materials have the ability to slow down the proliferation of tumor cells in contact with them. This approach is promising, since today there are no materials with an optimal set of such properties.

This study was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (modification of polysaccharides - project no. 121082600034-5, obtaining materials and study of properties - project no. 0657-2020-0004).

References

1. *Shcheblykina A.V., Mishchenko P.V., Kumeiko V.V. Biocompatible degradable materials based on pectins for tissue engineering: local tissue reaction during subcutaneous implantation // Pacific Medical Journal. 2013. # 2 (52).*
2. *Ng J.C.H. et al. Effects of surgery on neurocognitive function in patients with glioma: a meta-analysis of immediate post-operative and long-term follow-up neurocognitive outcomes // Journal of Neuro-Oncology. 2019. # 1 (141). pp. 167–182.*
3. *Saito H.et al. Evaluation of a Poly (Lactic-Co-Glycolic) Acid–Coated β-Tricalcium Phosphate Bone Substitute for Alveolar Ridge Preservation: Case Series // Clinical Advances in Periodontics. 2017. # 4 (7). pp. 190–194.*

УДК 615.462-036.5 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-20-21

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОРЕЗОРБИРУЕМЫХ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА, ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА И ТРИКАЛЬЦИЙФОСФАТА

Булыгина И.Н., Зимина А.И., Жукова П.А., Сенатов Ф.С.

Национальный Исследовательский Технологический Университет «МИСиС», Москва, Россия
119049, Москва, Ленинский проспект, д. 4 , стр. 1
e-mail: inna.bolik@gmail.com

Разработаны композиционные материалы на основе полилактида, полигидроксибутирата и трикальцийфосфата для восстановления ненагруженных дефектов кости.

Ключевые слова: соосаждение; трикальцийфосфат; эффект памяти формы; 3Д-печать; полилактид; полигидроксибутират.

Использование биорезорбируемых материалов в реконструктивной хирургии может быть сопряжено с потерей механической стабильности имплантируемой конструкции. Введение наполнителя приводит к дисперсному упрочнению полимерной матрицы. Помимо этого добавление биоактивной керамики, например такой как трикальцийфосфат (ТКФ), приводит к образованию слоя апатита при инкубации в SBF-растворе и следовательно в организме. Сочетание биорезорбируемых полимера и керамики приводит к полному замещению конструкции нативной костной тканью.

Одним из самых распространенных методов синтеза биокерамик является соосаждение. К раствору нитрата кальция добавили раствор гидрофосфата аммония, при доведении pH до 10 образуется гидроксиапатит, который при кальцинации переходит в ТКФ. Однофазный β-ТКФ может быть получен в ходе кальцинации при 800□ в течение 5 часов. Так в данном исследовании были получены частицы ТКФ размером менее 300 нм, проведено исследование частиц методами ИК-Фурье спектроскопии, рентгеновской дифракции и просвечивающей электронной микроскопии. При этом до кальцинации продукт представлял собой игольчатые частицы диаметром менее 10 нм, которые при термообработке стали сферическими, при укрупнении мезопористыми частицами. β-ТКФ сочетает в себе остеокондуктивность и остеоиндкутивность, а также является перспективным носителем для костных морфогенетических белков и антибиотиков.

Впоследствии были разработаны композиционные материалы полилактид/ТКФ и полигидроксибутират/ТКФ. Смешивание проводилось в двухшнековом микрокомпаундере, полученный филамент был

использован для 3Д-печати скаффолдов. Помимо этого были напечатаны образцы для демонстрации эффекта памяти формы в этих полимерах. Исходные полимеры и композиционные материалы были исследованы методами дифференциальной сканирующей калориметрии, ИК-Фурье спектроскопии. По результатам исследований оценена степень кристалличности, которая может влиять на проявление эффекта памяти формы в этих материалах. Также проведена сканирующая электронная микроскопия, как композиционных материалов, так и скаффолдов, определена толщина слоев и размер пор скаффолдов, а также с помощью EDX распределение частиц биокерамики в полимерной матрице.

Таким образом, в данной работе предложены композиционные материалы на основе биорезорбируемого полимера и биоактивной керамики для 3Д-печати самоустанавливающихся имплантатов для восстановления костной ткани. Продемонстрировано влияние биокерамики на эффект памяти формы в изученных полимерах. Подготовлен демонстрационный образец – скаффолд для реконструкции фрагмента черепа.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-73-20205).

UDC 615.462-036.5 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-20-21

INVESTIGATION OF BIORESORBABLE COMPOSITE MATERIALS BASED ON POLYLACTIDE, POLYHYDROXYBUTYRATE AND TRICALCIUM PHOSPHATE

I.N. Bulygina, A.I. Zimina, P.A. Zhukova, F.S. Senatov

National University of Science and Technology MISiS, Moscow, Russia
119049, Moscow, Leninsky Prospekt, 4 , b. 1
e-mail: inna.bolik@gmail.com

Composite materials based on polylactide, polyhydroxybutyrate and tricalcium phosphate have been developed for the reconstruction of unloaded bone defects.

Key words: co-precipitation; tricalcium phosphate; shape memory effect; 3D-printing; polylactide; polyhydroxybutyrate.

The use of bioresorbable materials in reconstructive surgery may be associated with a loss of mechanical stability of the implanted construction. The introduction of a filler leads to a dispersed reinforcement of the polymer matrix. In addition, the addition of bioactive ceramics, such as tricalcium phosphate (TCP), leads to the formation of an apatite layer during immersion in SBF solution and, consequently, in the body. The combination of bioresorbable polymers and ceramics leads to the complete replacement of the construction with native bone tissue.

One of the most common methods of synthesis of bioceramics is co-precipitation. A solution of ammonium hydrophosphate was added to the calcium nitrate solution, when the pH is brought to 10, hydroxyapatite is formed, which turnes into TCP during calcination. Single-phase β-TCP can be obtained during calcination at 800□ for 5 hours. Thus, in this study, TCP particles with a size of less than 300 nm were obtained, the particles were studied by FT-IR spectroscopy, X-ray diffraction and transmission electron microscopy. At the same time, before calcination, the product was needle-like particles with a diameter of less than 10 nm, which became spherical during heat treatment, when enlarged - mesoporous particles. β-TCP combines osteoconductivity and osteoinductivity, and is also a promising carrier for bone morphogenetic proteins and antibiotics.

Subsequently, the composite materials polylactide/TCP and polyhydroxybutyrate/TCP were developed. Mixing was carried out in a twin-screw microcompounder, the resulting filament was used for 3D-printing of scaffolds. In addition, samples were printed to demonstrate the shape memory effect in these polymers. The initial polymers and composite materials were studied by differential scanning calorimetry, FT-IR spectroscopy. According to the results of the research, the degree of crystallinity, which can affect the occurrence of the shape memory effect in these materials, is estimated. Scanning electron microscopy of both composite materials and scaffolds was also performed, the thickness of the layers and the pore size of the scaffolds were determined, as well as the distribution of bioceramic particles in the polymer matrix using EDX.

Thus, in this work, composite materials based on a bioresorbable polymer and bioactive ceramics for 3D-printing of self-installing implants for bone tissue reconstruction are proposed. The effect of bioceramics on the shape memory effect in the studied polymers is demonstrated. A demonstration sample – a scaffold for the reconstruction of a skull fragment has been prepared.

This work is supported by the Russian Science Foundation (project № 21-73-20205).

УДК: 606, ББК: 19 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-22-24

БИОАКТИВНЫЙ БИОПРАСТИЧНЫЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ ИОННО-ТРЕКОВЫХ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ И НАНО-КАРКАСА ХИТОЗАНА

И.И. Виноградов[1], А.Н. Нечаев[1], П.С. Еремин[2], И.Р. Гильмутдинова[2]

1 Объединённый институт ядерных исследований, Россия, 141980, Дубна, ул.Жолио-Кюри, 6, Ily7345@gmail.com, +79154017667, nechaeffalexander@yandex.ru, +79250339401
2 ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Министерства здравоохранения РФ, Россия, 121099, Москва, Новый Арбат, 32, Ereminps@gmail.com, +79261164646, Gilm.ilmira@mail.ru, +79686861979
3 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Россия, 105064, Москва, пер. Малый Казенный, 5А, poddubikov@yandex.ru, +7 (495) 917-22-17

В работе представлены результаты создания биоактивного биопластического материала (БИО) на основе ионно-трековых раневых покрытий (ИТРП) и нано-каркаса хитозана полученного методом электроформования. Исследована водо- и газопроницаемость, предел прочности БИО ИТПР. Проведена оценка бактериостатичности, цитотоксичности и биосовместимости БИО ИТРП

Ключевые слова: биоактивный биопрастичный материал, ионно-трековые раневые покрытия, хитозан, нано-каркас

Интенсивное развитие клеточных технологий, применяемых в новой области медицины — регенеративной медицине, требует разработки новых материалов, которые могут служить субстратами для культивируемых клеток.[1] Одним из перспективных направлений в области бионанотехнологий является технология бескапиллярного электроформования (ЭФ) нановолокон из растворов полимеров, отличающихся сверхразвитой структурой и пористостью.[2] Важным направлением совершенствования пленочных раневых покрытий является повышение их паропроницаемости при сохранении барьерной функции в отношении микроорганизмов. Таким барьером может являться трековая мембрана, как потенциально раневое покрытие выпускаемое на базе ЛЯР им. Г.Н. Флерова ОИЯИ. Она обеспечивает задаваемые параметры газо- и водопроницаемости, в том числе и предотвращение бактериальной и возможно вирусной контаминации в регенерируемых кожных покровах. [3,4] Совмещение нано-каркаса хитозана и ИТРП позволит получить БИО ИТРП для регенеративной медицины с вышеописанными свойствами.

Цель настоящей работы заключалась в создании перспективного БИО ИТРП и исследовании его функциональных свойств, бактериостатичности, цитотаксичности и биосовместимости.

Электроформование нано-каркаса хитозана, осуществлялось на базе коммерческой установки Nanon – 01A. В качестве осадительного электрода коллектора, для получения однородного, повторяющегося слоя нано-каркаса хитозана была использована специально разработанная ИТРП металлизированное титаном. В качестве формовочного раствора использовался 4% раствор хитозан/ПЭО (90/10). [5] Для предотвращения быстрой гидролитической деструкции нановолокон хитозана производилась термическая и химическая сшивка. [1,6]

Полученный материал обладает высокой прочностью, эластичностью, водо- и газопроницаемостью, что удовлетворяет требованиям предъявленным к раневому покрытию. Установлено, что ИТРП и БИО ИТРП обладали бактериостатическим влиянием на штамм Bacillus cereus ATCC 10702, обнаруженная активность, не связана с хитозаном. Оценка цитотаксичности и биосовместимости БИО ИТРП на коммерческой культуре клеток фибробластов кожи человека HDF (Cell Applications, США, кат. № 106K-05a) показала, что полученный материал не цитотаксичен и биосовместим. В результате был создан потенциально биоактивный биопластический материал на основе ИТРП и нано-каркаса хитозана для решения задач в регенеративной медицине.

Литература

1. Панарин Е.Ф. и др. Композиционные матрицы на основе хитина и хитозана для культивирования клеток кожи человека // Гены и Клетки. 2010.Т. 5 №1.

2. Прокопчук Н.Р. и др. Инновационные раневые покрытия с нановолокнами хитозана // Труды БГДУ. 2017. Т. 1, № 2. С. 15–22.

3. Андреев Д.Ю. и др. Современные Раневые Покрытия. Часть I // Вестник Хирургии Имени И.И. Грекова. 2009. Т. 168, № 3.

4. Apel P.Yu. Ion-track membranes and their use in biological and medical applications // AIP Conf. Proc. 2007. T. 912. C. 488–494.

5. Хоменко А.Ю. и др. Матрицы на основе нановолокон хитозана для клеточных технологий // Российские нанотехнологии. 2013. Т. 9. С. 41–45.

6. Li B. и др. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Cross-Linked Chitosan-Glutaraldehyde // Mar. Drugs. 2013. T. 11, № 5. C. 1534–1552.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-22-24

BIOACTIVE BIOPLASTIC MATERIAL BASED ON ION-TRACK WOUND COATINGS AND CHITOSAN NANO-SCAFFOLD

I.Vinogradov[1], A.Nechaev[1], P.Eremin[2], I.Gilmutdinova[2]

1 Joint Institute for Nuclear Research, Russia, 141980, Dubna, Joliot-Curie Street, 6
2 Federal State Budgetary Institution "National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Russia, 121099, Moscow, Novy arbat street, 32
3 I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums, Russia, 105064, Moscow, Novy arbat street, 5A

The paper presents the results of the development of a bioactive bioplastic material (BIO) based on ion-track wound coatings (ITRP) and a nano-scaffold of chitosan obtained by electroforming. The water and gas permeability, the ultimate strength, bacteriostaticity, cytotoxicity and biocompatibility of BIO ITPR were investigated.

Key words: bioactive bioplastic material, ion-track wound coatings, chitosan, nano-scaffold

The intensive development of cellular technologies used in a new field of medicine such as regenerative medicine. The development of new materials, that can serve as substrates for cultured cells is requires. [1] One of the promising directions in the field of bionanotechnology is the technology of capillary-free electroforming (EF) of nanofibers from polymer solutions, which characterized by an ultra-developed structure and porosity. [2] An important area of improvement of film wound coatings is to increase their vapor permeability while maintaining the barrier function against microorganisms. Such a barrier can be a track membrane, as a potentially wound coating produced in the FLNR of JINR. It provides the specified parameters of gas and water permeability, including the prevention of bacterial and possibly viral contamination in the regenerated skin. [3, 4] The combination of the chitosan nano-scaffold and ITRP will make it possible to obtain BIO-ITRP for regenerative medicine with the above-described properties.

The purpose of this work was to create a promising BIO-ITP and study its functional properties, bacteriostaticity, cytotaxicity and biocompatibility.

Electroforming of a bioactive nano-scaffold chitosan, carried out on the commercial Nanon – 01A installation. A specially developed titanium-metallized ITRP used as the collector's precipitating electrode to produce a homogeneous, repetitive layer of the chitosan nano-scaffold. A 4% chitosan/PEO solution (90/10) used as the molding solution. [5] Thermal and chemical cross-linking performed to prevent rapid hydrolytic degradation of chitosan nanofibers. [1, 6]

The resulting material has high strength, elasticity, water and gas permeability, which meets the requirements for wound coating. It was found that ITRP and BIO-ITRP had a bacteriostatic effect on the Bacillus cereus strain ATCC 10702, the detected activity is not associated with chitosan. Evaluation of cytotoxicity and biocompatibility of BIO-ITRP on commercial human skin fibroblast cell culture HDF (Cell Applications, USA, cat. No. 106K-05a) showed that the resulting material is not cytotactic and biocompatible. As a result, a potentially bioactive bioplastic material based on ITRP and a chitosan nano-scaffold was created, and can be used for the solving of the problems in regenerative medicine.

References

1. Panarin E. F. et al. Composite matrices based on chitin and chitosan for the cultivation of human skin cells // Genes and Cells. 2010. T. 5 № 1.

2. Prokopchuk N. R. et al. Innovative wound coatings with chitosan nanofibers / / Trudy BSTU. 2017. Vol. 1, №. 2. pp. 15-22.

3. Andreev D. Yu. et al. Modern Wound Coverings. Part I // Bulletin of surgery named after I. I. Grekov. 2009. Vol. 168, № 3.

4. Apel P.Yu. Ion-track membranes and their use in biological and medical applications // AIP Conf. Proc. 2007. T. 912. C. 488–494.

5. Khomenko A. Yu., et al. Matrices based on chitosan nanofibers for cell technologies / / Russian Nanotechnologies. 2013. Vol. 9. pp. 41-45.

6. Li B. et al. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Cross-Linked Chitosan-Glutaraldehyde // Mar. Drugs. 2013. T. 11, № 5. C. 1534–1552.

УДК: 615.4, ББК: 28.087.1 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-24-25

БИОПОЛИМЕРНЫЕ АНТИСЕПТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

А.В. Владимирова

ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Россия, 660135, Красноярск, Батурина, 7, aleksa-vladimirova@yandex.ru, 89135164024

Разработаны биополимерные матрицы на основе поли(3-гидроксибутирата) с сополимером поли(3-гидроксивалератом) (П(3ГБ)-со-П(3ГВ) с депонированным антисептиком местного действия Бриллиантовым зеленым и ковалентно пришитым коллагеном 1-го типа и протеинатом серебра.

Ключевые слова: Полигидроксиалканоаты, системы пролонгированного действия, системы доставки лекарств, ранозаживление, реконструктивные технологии, антисептики, коллаген 1-го типа, протеинат серебра

Технологии пролонгированной доставки лекарств представляют собой одну из пограничных областей науки между химией, физикой, биологией и медициной. Такие системы обладают многочисленными преимуществами по сравнению с лекарственными формами прошлого поколения, и включают в себя уменьшенную токсичность, улучшенные эффективность и совместимость с пациентом и удобство использования. Пролонгированный эффект подобных носителей биологически активных веществ достигается благодаря контролируемому замедленному высвобождению депонированного лекарства из полимерной системы, например, микросфер. Также, аналогичные системы могут быть с успехом использованы в тканевой инженерии для инъекционного восполнения дефектов тканей. В этом направлении развитие полимерных биотехнологий и поиск новых биоразрушаемых и биосовместимых макромолекул помогает улучшать материалы и конструкции. Более того, возможно создание материалов с противомикробными, противовоспалительными и ускоряющими регенерацию препаратами для борьбы с инфекцией и пластики тканей на местном уровне.

Использование микросферических частиц для тканевой инженерии является очень перспективным подходом, принимая во внимание значительную общую площадь поверхности и высокопористую структуру микросфер. Микрочастицы для тканевой инженерии должны быть биоразлагаемыми и биосовместимыми, скорость разложения должна точно соответствовать скорости образования ткани, а химический состав и структура поверхности должны способствовать адгезии, пролиферации и дифференцировке клеток. Практически уникальным материалом, удовлетворяющим этим основным требованиям, являются бактериальные полигидроксиалканоаты, ПГА, обладающие высокой степенью биосовместимости и биоразлагаемости [1].

В нашей работе были использованы микрочастицы из сополимера 3-гидроксибутирата с 3-гидроксивалератом (П(3ГБ)-со-П(3ГВ), 1500 кДа, содержание 3ГВ 18% с депонированным антисептиком местного действия Бриллиантовым зеленым и ковалентно пришитыми коллагеном 1-го типа и протеинатом серебра.

Была изучена кинетика выхода антисептика, коллагена и протеината серебра, эффективность антибактериального действия в культурах Staphylococcus aureus и Escherichia coli, а также биосовместимость полученных микрочастиц in vitro по оценке цитотоксичности материала и жизнеспособности фибробластов NIH 3T3. Было показано, что модификации поверхности коллагеном 1-го типа и протеинатом серебра улучшает клеточную адгезию и биосовместимость системы локальной доставки антисептика. Использование чистого Бриллиантового зеленого приводило к полной гибели клеток, в то время как депонированный в П(3ГБ)-со-П(3ГВ)-матрицу антисептик проявлял значительно меньшее цитотоксическое действие. В присутствии микрочастиц с протеинатом серебра выживаемость фибробластов NIH 3T3 была выше на 20 % по сравнению с системой без модификаций. Изменение значения дзета-потенциала микрочастиц, модифицированных

протеинатом серебра позволяет предположить, что их распределение и поведение в организме будет отличаться от других систем, что представляется перспективным для дальнейшего изучения. Полученная система показала достаточную эффективность по сравнению с официнальной формой препаратов.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям (Договор 16050ГУ/2020 от 24.12.2020)

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-24-25

BIOPOLYMER ANTISEPTIC SYSTEMS BASED ON POLYHYDROXYALKANOATES FOR SOFT TISSUE RECONSTRUCTIVE TECHNOLOGIES

A.Vladimirova

Siberian Federal University, Russia, 660135, Krasnoyarsk, Baturina, 7

Biopolymer matrices based on poly (3-hydroxybutyrate) with a copolymer poly (3-hydroxyvalerate) (P (3HB) -co-P (3HV) with a deposited local antiseptic Brilliant Green and covalently attached type 1 collagen and silver proteinate have been developed.

Key words: Polyhydroxyalkanoates, sustained-release systems, drug delivery systems, wound healing, reconstructive technologies, antiseptics, type 1 collagen, silver proteinate

Sustained drug delivery technologies represent one of the frontier areas of science between chemistry, physics, biology and medicine. Such systems offer numerous advantages over prior generation dosage forms, including reduced toxicity, improved efficacy, patient compatibility and usability. The prolonged effect of such carriers of biologically active substances is achieved due to the controlled delayed release of the deposited drug from the polymer system, for example, microspheres. Also, similar systems can be successfully used in tissue engineering for injection tissue defects. In this direction, the development of polymer biotechnology and the search for new biodegradable and biocompatible macromolecules helps to improve materials and designs. Moreover, it is possible to create materials with antimicrobial, anti-inflammatory and regeneration-accelerating drugs for infection control and tissue repair at the local level.

The use of microspheroidal particles for tissue engineering is a very promising approach, given the significant total surface area and highly porous structure of the microspheres. Microparticles for tissue engineering must be biodegradable and biocompatible, the rate of degradation must exactly match the rate of tissue formation, and the chemical composition and surface structure must promote cell adhesion, proliferation, and differentiation. Bacterial polyhydroxyalkanoates, PHA, which have a high degree of biocompatibility and biodegradability, are practically unique materials that meet these basic requirements [1].

In our work, we used microparticles from a copolymer of 3-hydroxybutyrate with 3-hydroxyvalerate (P (3HB) -co-P (3HV), 1500 kDa, 18% 3HV content with a deposited local antiseptic Brilliant Green and covalently atitched collagen type 1 and silver proteinate.

The kinetics of the release of antiseptic, collagen and silver proteinate, the effectiveness of antibacterial action in cultures of Staphylococcus aureus and Escherichia coli, as well as the biocompatibility of the obtained microparticles in vitro by assessing the cytotoxicity of the material and the viability of NIH 3T3 fibroblasts were studied. Surface modification with type 1 collagen and silver proteinate has been shown to improve cell adhesion and biocompatibility of the local antiseptic delivery system. The use of pure Brilliant Green led to complete cell death, while the antiseptic deposited in the P (3HB) -co-P (3HV) -matrix exhibited a significantly lower cytotoxic effect. In the presence of silver proteinate microparticles, the survival rate of NIH 3T3 fibroblasts was 20% higher compared to the system without modifications. The change in the zeta potential value of microparticles modified with silver proteinate suggests that their distribution and behavior in the body will differ from other systems, which seems promising for further study. The resulting system has shown sufficient efficiency in comparison with the official form of drugs.

Grant: This work was supported by the Fund for the Promotion of Innovations (Contract 16050GU / 2020 of December 24, 2020).

References:

Zhang J., Shishatskaya E., Volova T. et al. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications//Mater. Sci. Eng. C. 2018. Vol. 86. P. 144-150.

УДК 615.468.74 6 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-26-27

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И CeO_2

Девятаева А.А., Ревин В.В., Русяева В.В., Старостина О.И.

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва, Россия, 430005, Саранск, Большевистская 68
e-mail: ania.devyataeva@yandex.ru

Данная работа направлена на получение умных материалов с улучшенными функциональными характеристиками для биомедицинского применения.

Ключевые слова: Наночастицы оксида церия (IV), бактериальная целлюлоза, стабилизатор, механические свойства, биомедицина.

В настоящее время значительный интерес представляют нанокомпозитные материалы на основе биополимеров и оксидов металлов. Они широко используются при доставке лекарственных средств, в тканевой инженерии, а также в биосенсорных и диагностических устройствах и т.д. [1,2].

Целью работы являлось получение и исследование пленок на основе бактериальной целлюлозы и наночастиц оксида церия (IV).

Для изучения структуры и свойств исследуемых материалов применялись следующие методы: СЭМ, ИК-спектроскопия, рентгеноструктурный анализ.

В результате были получены биопленки с равномерным распределением наночастиц CeO_2. Изучены структурные, морфологические и механические характеристики материалов. Включение в состав пленки CeO_2 позволило значительно повысить механическую прочность материалов от 5 до 8 МПа, при этом снижалась способность к набуханию материала на 50,2 % по сравнению с контрольным образцом.

Таким образом, полученные композитные материалы на основе бактериальной целлюлозы и стабилизированных наночастиц CeO_2 могут являться перспективными полимерами для создания лекарственных форм с улучшенными фармакологическими и фармакокинетическими свойствами, в которых бактериальная целлюлоза будет выступать в качестве матрицы, а наночастицы будут обеспечивать улучшение ее функциональных свойств.

Работа выполнена при финансовой поддержки Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-515-80002/20)

Литература

1. *Abbasi1 Y. F, Bera H. Biopolymer–metal oxide composites in biomedical applications // Tailor-Made and Functionalized Biopolymer Systems. – 2021. – Vol.7. –P. 203-251.*
2. *Hua Zheng, Shenqiang Wang, Fang Cheng, Xiaowei He, Zongxu Liu, Wenyan Wang, Li Zhou, Qiuyu Zhang Bioactive anti-inflammatory, antibacterial, conductive multifunctional scaffold based on MXene@CeO2 nanocomposites for infection-impaired skin multimodal therapy // Chemical Engineering Journal. – 2021. – Vol. 424. – P.130-148.*

UDC 615.468.74 6 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-26-27

RESEARCH OF PHYSICAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF COMPOSITE MATERIALS BASED ON BACTERIAL CELLULOSE AND CeO_2

A.A. Devyataeva, V.V. Revin, V.V. Rusyaeva, O.I. Starostina

National research N. P. Ogarev Mordovia state university, Saransk, Russia
68 Bolshevistskaya Str., Saransk 430005
e-mail: ania.devyataeva@yandex.ru

This work is aimed at obtaining smart materials with improved functional characteristics for biomedical applications.

Key words: cerium oxide nanoparticles (IV), bacterial cellulose, stabilizer, mechanical properties, biomedicine.

At present time, nanocomposite materials based on biopolymers and metal oxides are of considerable interest. They are widely used in drug delivery, tissue engineering, biosensor and diagnostic devices, etc. [1, 2]

The purpose of this work was to production and study films based on bacterial cellulose and cerium oxide nanoparticles (IV).

The methods were used to study the structure and properties of the materials under study: SEM, IR spectroscopy, X-ray structural analysis.

As a result, we have produced biofilms with a uniform distribution of CeO_2 nanoparticles. Structural, morphological and mechanical characteristics of materials have been studied. The inclusion of CeO_2 in the composition of the film made it possible to significantly increase the mechanical strength of materials from 5 to 8 MPa, while the swelling capacity of the material decreased by 50.2% compared to the control sample.

Thus, the obtained composite materials based on bacterial cellulose and stabilized CeO_2 nanoparticles can be promising polymers for creating dosage forms with improved pharmacological and pharmacokinetic properties, in which bacterial cellulose will act as a matrix, and nanoparticles will improve its functional properties.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (№ 19-515-80002/20)

References

1. *Abbasi1 Y. F, Bera H. Biopolymer–metal oxide composites in biomedical applications // Tailor-Made and Functionalized Biopolymer Systems. – 2021. – Vol.7. –P. 203-251.*
2. *Hua Zheng, Shenqiang Wang, Fang Cheng, Xiaowei He, Zongxu Liu, Wenyan Wang, Li Zhou, Qiuyu Zhang Bioactive anti-inflammatory, antibacterial, conductive multifunctional scaffold based on MXene@CeO2 nanocomposites for infection-impaired skin multimodal therapy // Chemical Engineering Journal. – 2021. – Vol. 424. – P.130-148.*

УДК 615.462-036.5 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-27-29

ЭФФЕКТ ПАМЯТИ ФОРМЫ И ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ПОЛИМЕРНЫХ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА ДЛЯ АДАПТИВНЫХ МЕДИЦИНСКИХ КОНСТРУКЦИЙ

Жукова П.А.[1], **Сенатов Ф.С.**[1], **Сурменев Р.А.**[2], **Парий И.О.**[2]

[1] *Национальный Исследовательский Технологический Университет «МИСиС»*
119049, Москва, Ленинский проспект, д. 4, стр. 1
[2] *Томский Политехнический Университет*
634050, г. Томск, проспект Ленина, дом 30
e-mail: zhukova.pa@yandex.ru

Снижены параметры активации эффекта памяти формы полилактида путем создания на его основе полимер-полимерного композиционного материала. Усовершенствованный материал был использован для получения пористых скаффолдов методом электроспиннингования, для скаффолдов исследовались эффект памяти формы и пьезоэлектрического эффекта.

Ключевые слова: эффект памяти формы, пьезоэлектрический эффект, полилактид, поликапролактон, полимерные композиционные материалы.

В современной медицине существует тенденция к переходу от металлических материалов к полимерным. Одним из наиболее распространенных полимеров, уже используемых в медицине, является полилактид (ПЛА). Этот полимер является биосовместимым, способен деградировать в организме с образованием молочной кислоты, легок в обработке, а также его получают из возобновляемых источников. В то же время прогресс в области материаловедения привел к созданию и исследованию «умных» материалов, которые способны проявлять какие-либо свойства в ответ на внешние условия и воздействия. Полилактид характеризуется ярко выраженным эффектом памяти формы (ЭПФ), а также проявляет и пьезоэлектрические свойства, что делает его крайне перспективным для создания адаптивных медицинских конструкций.

Эффект памяти формы чистого полилактида имеет ограничения, которые не позволяют применять его в медицинских целях – ЭПФ реализуется при температуре стеклования (55-65 °C), что является высокой температурой для воздействия на ткани организма. Одной из задач данной работы стало снижение

температуры начала активации и кажущейся энергии активации эффекта памяти формы. Достичь этого позволяют пластификаторы, которые облегчают движение молекулярных цепей и реализацию эффекта памяти формы. Таким образом, был разработан композиционный материал на основе полилактида, где за счет добавления поликапролактона (ПКЛ) температура активации была снижена до допустимых 45 °C, а кажущаяся энергия активации на 85 кДж.

ПЛА обладает пьезоэлектрическими свойствами, что делает его еще более перспективным материалом для использования в тканевой инженерии, так как индуцируемые механическими напряжениями электрические сигналы стимулируют рост и деление клеток, способствуя заживлению тканей. В связи с этим предварительно полученный полимер-полимерный композиционный материал использовался для создания пористых скаффолдов методом электроспиннингования. Для повышения пьезоэлектрического отклика материала в состав вводились частицы восстановленного оксид графена (rGO), материала с выдающимися электрическими свойствами. Введение в состав дисперсных частиц также влияет на морфологическую структуру и кристалличность полимерной матрицы, поэтому добавление в состав полимерного композита частиц rGO может иметь влияние не только на пьезоэлектрический отклик, но и на реактивные напряжения эффекта памяти формы.

Полученный в данной работе композиционный материал является перспективным для создания адаптивных конструкций и использования их в тканевой инженерии и других медицинских применениях.

Исследование выполнено за счет гранта Российского Научного Фонда (проект №21-73-20205)

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-27-29

SHAPE MEMORY EFFECT AND PIEZOELECTRIC EFFECT OF POLYMER COMPOSITE MATERIALS BASED ON POLYLACTIDE FOR ADAPTIVE MEDICAL STRUCTURES

P.A. Zhukova[1], **F.S. Senatov**[1], **R.A. Surmenev**[2], **I.O. Pariy**[2]

1 National Research Technological University "MISIS"
119049, Moscow, Leninsky Prospekt, 4, p. 1
2 Tomsk Polytechnic University
30 Lenin Avenue, Tomsk, 634050
e-mail: zhukova.pa@yandex.ru

The activation parameters of the Shape memory effect of polylactide were reduced by creating a polymer-polymer composite material based on it. The improved material was used to obtain porous scaffolds by electro-spinning, the shape memory effect and the piezoelectric effect were studied for these scaffolds.

Keywords: shape memory effect, piezoelectric effect, polylactide, polycaprolactone, polymer composite materials

In modern medicine, there is a tendency to switch from metal materials to polymer ones. One of the most common polymers already used in medicine is polylactide (PLA). This polymer is biocompatible, is able to degrade in the body with the formation of lactic acid, is easy to process, and it is also obtained from renewable sources. At the same time, progress in the field of materials science has led to the creation and research of "smart" materials that are able to realize some properties in response to external conditions and influences. Polylactide is characterized by a distinct shape memory effect (SME), and also shows piezoelectric properties, which makes it extremely promising for creating adaptive medical structures.

The memory effect of the form of pure polylactide has limitations that do not allow it to be used for medical purposes – SME is realized at a glass transition temperature (55-65 °C), which is a high temperature for exposure to body tissues. One of the goals of this research was to reduce the activation temperature and the apparent activation energy of the shape memory effect. This is achieved by plasticizers that facilitate the movement of molecular chains and the implementation of the shape memory effect. Thus, a composite material based on polylactide was developed, where due to the addition of polycaprolactone (PCL), the activation temperature was reduced to an acceptable 45 °C, and the apparent activation energy was reduced by 85 kJ.

The PLA shows piezoelectric properties, which makes it an even more promising material for use in tissue engineering, since electrical signals induced by mechanical stresses stimulate cell growth and division, promoting tissue healing. In this regard, the previously obtained polymer-polymer composite material was used to create porous scaffolds by electrospinning. To increase the piezoelectric response of the material, particles of reduced graphene oxide (rGO), a material with outstanding electrical properties, were introduced into the composition. The

introduction of dispersed particles into the composition also affects the morphological structure and crystallinity of the polymer matrix, therefore, the addition of rGO particles to the polymer composite can affect not only the piezoelectric response, but also the recovery stress of the shape memory effect.

The composite material obtained in this work is promising for creating adaptive structures and using them in tissue engineering and other medical applications.

The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation (project No. 21-73-205)

УДК: 577.152.192:541.64 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-29-31

АНТИМИКРОБНОЕ ПЛЕНОЧНОЕ ПОКРЫТИЕ НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТАТИВНО СИНТЕЗИРОВАННОГО ПОЛИАНИЛИНА, ДОПИРОВАННОГО ИОНАМИ МЕДИ

И.В. Васильева[1], М.Е. Хлупова[1], Г.П. Шумакович[1], Е.А. Зайцева[2], Е.В. Громова[3], О.В. Морозова[1]

1Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский пр-кт, д. 33, стр. 2, e-mail: morozova@inbi.ras.ru
2Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, e-mail: ezaitseva2008@gmail.com
3 Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

На матрице полистиролсульфоната натрия (ПСС) осуществлен ферментативный синтез полианилина (ПАНИ), допированного ионами двухвалентной меди. Синтезированный интерполимерный комплекс ПАНИ Cu^{2+}/ПСС обладал выраженным антимикробным действием против бактерий *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

Ключевые слова: лакказа, биокаталитический синтез, полианилин, ионы меди, антимикробная активность, пленочное покрытие

В последние десятилетия большое внимание уделяется гибридным системам и композитам на основе электропроводящего полианилина (ПАНИ), что связано с перспективой использования этих материалов в различных областях. Электропроводящую форму ПАНИ, эмеральдиновую соль, можно получить как протонированием, так и допированием цепи ПАНИ кислотами Льюиса, йодом, солями переходных металлов [1]. Использование в качестве допанта ПАНИ солей двухвалентной меди может быть перспективным для разработки антимикробных покрытий. Ионы меди, как и ПАНИ, допированный кислотами, обладают антимикробными свойствами [2]. Использование ионов меди Cu^{2+} в качестве допанта основной цепи полимера, может привести к усилению антимикробных свойств ПАНИ.

Разработан подход для получения ПАНИ, допированного ионами двухвалентной меди. После полимеризации анилина на матрице полистиролсульфоната натрия (ПСС) с использованием высоко редокс потенциальной грибной лакказы *Trametes hirsuta*, интерполимерный комплекс ПАНИ/ПСС был переведен в нейтральную форму эмеральдинового основания обработкой щелочью, а затем редопирован сульфатом меди (молярное соотношении анилин/$CuSO_4$=1:1). Полученные комплексы ПАНИ/ПСС и ПАНИ Cu^{2+}/ПСС были исследованы различными физико-химическими методами. Весовое содержание меди в образце ПАНИ Cu^{2+}/ПСС по данным рентгенофлуоресцентного анализа составляло 8,2 %. Исследование комплексов методом УФ-видимой спектроскопии показало, что полоса поглощения дедопированного комплекса ПАНИ/ПСС после его редопирования ионами меди, сдвигалась в длинноволновую область спектра (с 504 до 760 нм). FTIR-исследование показало, что при допировании комплекса ПАНИ/ПСС ионами двухвалентной меди, на спектре пропускания появляются новые полосы при 1320, 1369 и 1567 $см^{-1}$.

Водные дисперсии комплексов ПАНИ/ПСС и ПАНИ Cu^{2+}/ПСС были протестированы на антимикробную активность. В качестве тест-объектов использовали микроорганизмы основных таксономических групп: грамположительные (*Staphylococcus aureus*) и грамотрицательные (*Escherichia coli*) бактерии и дрожжи (*Yarrowia lipolytica*). Антимикробную активность определяли в соответствие с рекомендациями МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

О наличии роста микробных культур судили по повышению мутности в пробирках с питательной средой, определяемой спектрофотометрически при λ=480 нм. Показано, что ПАНИ Cu^{2+}/ПСС обладал выраженным антимикробным действием против бактерий и не оказывал влияния на рост *Y. Lipolytica*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (проект № 19-08-00420).

Литература

1. *Izumi C.M.S., Ferreira A.M.D.C., Constantino V.R.L., Temperini M.L.A. Studies on the interaction of emeraldine base polyaniline with Cu(II), Fe(III), and Zn(II) ions in solutions and films // Macromolecules 2007. Vol. 40. № 9. P. 3204–3212.*
2. *Robertson J., Gizdavic-Nikolaidis M., Nieuwoudt M.K., Swift S. The antimicrobial action of polyaniline involves production of oxidative stress while functionalisation of polyaniline introduces additional mechanisms // PEERJ 2018. Vol. 6. Article number e5135. https://doi.org/10.7717/peerj.5135 (дата обращения:25.07.2021)*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-29-31

ANTIMICROBIAL FILM COATING BASED ON ENZYMATICALLY SYNTHESIZED POLYANILINE DOPED WITH COPPER IONS

I.S. Vasil'eva[1], M.E. Khlupova[1], G.P. Shumakovich[1], E.A. Zaitseva[2], E.V. Gromova[3], O.V. Morozova[1]

1 Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, A. N. Bach Institute of Biochemistry, Moscow, Russia
119071, Moscow, Leninsky Ave. 33, bld. 2, e-mail: morozova@inbi.ras.ru
2 Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119991, Moscow, Leninskie Gory 1/3, e-mail: ezaitseva2008@gmail.com
3 Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia
117997, Moscow, Ostrovityanova st. 1

Enzymatic synthesis of polyaniline (PANI) doped with bivalent copper ions was carried out on a sodium polystyrene sulfonate (PSS) template. The synthesized interpolymer complex PANI-Cu^{2+}/PSS had an inhibitory effect on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* cells.

Keywords: laccase, biocatalytic synthesis, polyaniline, copper ions, antimicrobial activity, film coating

In recent decades, hybrid systems and composites based on conducting polyaniline (PANI) have attracted much attention, which is due to the prospect of using these materials in various fields. The conducting PANI state (the emeraldine salt) can be obtained by both protonation and doping of the PANI backbone with Lewis acids, iodine, and transition metal salts [1]. The use of copper (II) salts as a PANI dopant may be promising for the development of antimicrobial coatings. Copper ions and PANI doped with acids have antimicrobial properties [2]. The use of Cu^{2+} ions as a dopant for the polymer backbone can enhance the antimicrobial properties of PANI.

A new approach to the preparation of PANI doped with Cu^{2+} ions was proposed. After polymerization of aniline on a PSS matrix using the highly redox potential laccase *Trametes hirsuta*, the PANI/PSS interpolymer complex was converted to the neutral dedoped form (emeraldine base) by treatment with alkali, and then redoped with copper sulfate (aniline/$CuSO_4$ molar ratio = 1:1). PANI/PSS and PANI-Cu^{2+}/PSS complexes were studied by various physicochemical methods. According to X-ray fluorescence analysis, the weight content of copper in the PANI-Cu^{2+}/PSS sample was 8.2%. UV visible spectroscopy investigation showed that the absorption band of the dedoped PANI/PSS complex, after its redoping with copper ions, shifted to the long-wavelength region of the spectrum (from 504 to 760 nm). FTIR spectroscopy studies have shown that new bands at 1320, 1369, and 1567 cm^{-1} appeared in the PANI-Cu^{2+}/PSS spectrum.

Aqueous dispersions of the PANI/PSS and PANI-Cu^{2+}/PSS complexes were tested for the antimicrobial properties against Gram-negative (*Escherichia coli*) and Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) bacteria and yeast (*Yarrowia lipolytica*). The antibacterial properties were assessed according MUK 4.2.1890-04 "Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs." The growth of microbial cultures was determined spectrophotometrically at 480 nm by turbidity measurements of nutrient medium. It was shown that PANI-Cu^{2+}/PSS had an expressed antimicrobial effect against bacteria and did not affect the growth of *Y. lipolytica*.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project № 19-08-00420).

References

1. *Izumi C.M.S., Ferreira A.M.D.C., Constantino V.R.L., Temperini M.L.A. Studies on the interaction of emeraldine base polyaniline with Cu(II), Fe(III), and Zn(II) ions in solutions and films // Macromolecules 2007. Vol. 40. № 9. P. 3204–3212.*
2. *Robertson J., Gizdavic-Nikolaidis M., Nieuwoudt M.K., Swift S. The antimicrobial action of polyaniline involves production of oxidative stress while functionalisation of polyaniline introduces additional mechanisms // PEERJ 2018. Vol. 6. Article number e5135. https://doi.org/10.7717/peerj.5135 (25.07.2021)*

УДК 615.462-036.5 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-31-32

ПОЛИМЕРНЫЙ КОМПОЗИЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ КОСТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ С ВОЗМОЖНОСТЬЮ ИНТРАОПЕРАЦИОНОЙ КОРРЕКЦИИ ФОРМЫ

Зимина А.И.[1*], **Сенатов Ф.С.**[1], **Струкова Н.В.**[2], **Кривозубов М.С.**[2], **Генералова М.С.**[2], **Никитин К.Е.**[2], **Орлова П.А.**[2], **Грунина Т.М.**[2], **Попонова М.С.**[2], **Лунин В.Г.**[2], **Карягина А.С.**[2]

1 Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва, Россия 119049, Москва, Ленинский пр-т, д. 4, стр. 1
2 ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18
** e-mail: zimina_anya@mail.ru*

Разработан биомиметический композиционный материал на основе полилактида (ПЛА), поликапролактона (ПКЛ) и гидроксиапатита (ГАП) с высокой биосовместимостью и остеокондуктивными свойствами. Исследованы структурные и механические характеристикиматериала, а также проведены исследования *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: полилактид; костные имплантаты; биомиметика; скаффолд; регенерация костной ткани.

Для проведения операций в ненагруженных участках челюстно-лицевой области костные имплантаты из биорезорбируемых полимеров являются оптимальным решением. Однако помимо биосовместимости и соответствия механических характеристик таких материалов нативной кости, изделия из них должны быть удобными для интраоперационной обработки.

В качестве матрицы композиционного материала хорошо изученные биорезорбируемые биосовместимые полимеры выбраны – полилактид (ПЛА) и поликапролактон (ПКЛ). Использование смеси этих полимеров позволяет компенсировать такие недостатки, как хрупкость и жесткость ПЛА, а также низкую поверхностную энергию ПКЛ, препятствующую адгезии клеток к его поверхности. Гидроксиапатит (ГАП) – минеральная составляющая костной ткани, был добавлен в полимерную матрицу для повышения механических характеристик и биоактивности.

Методом литья из растворителя получали плёнки состава ПЛА/ПКЛ/ГАП с массовым соотношением компонентов 13:4:3. В растворённую в дихлорметане смесь полимеров добавляли также выварочную соль (NaCl) со сферическими частицами размером 300–500 μм для достижения необходимой пористости (70% об.), сопоставимой с пористостью нативной кости. Высушенные плёнки подвергали термопрессованию при 200 °С, полученные образцы обессоливали в дистиллированной воде. Исследование микроструктуры показало наличие системы открытых связанных между собой пор и равномерную пористость по всему объёму образца. ИК-Фурье спектроскопия показала наличие только тех химических связей, которые соответствуют каждому из компонентов композита. Модуль Юнга и предел прочности на разрыв составили, соответственно, 2,71 ± 0,29 и 151,38 ± 14,61 МПа, что соответствует механическим характеристикам костной ткани в ненагруженных частях организма. Также было замечено, что добавление ГАП оказало положительное влияние на изменение гидрофильности: для смеси полимеров ПЛА/ПКЛ краевой угол смачивания составил 77,9 ± 2,17 °, когда для для композита его значение снизилось до 66,2 ± 1,89 °. Исследования *in vivo* (на базе НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи) на образцах с нанесенными на их поверхность белковыми факторами – костным морфогенетическим белком (BMP-2) и эритропоэтином (EPO), продемонстрировали отсутствие воспалительных реакций и рост костной ткани. Кроме того, на образцах без

белков замечены следы остеогенеза с образованием костных структур, что свидетельствует о хорошей биосовместимости материала даже без введения белковых факторов роста.

Таким образом, на основании результатов физико-химических и биологических исследований пористого композиционного материала ПЛА/ПКЛ/ГАП можно сделать вывод о том, что медицинские изделия на его основе можно использовать в качестве костных имплантатов в ненагруженных участках тела.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-73-20205)

UDC 615.462-036.5 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-31-32

POLYMERIC COMPOSITE MATERIAL FOR BONE IMPLANTS WITH THE FEASIBILITY OF INTRAOPERATIVE FORM CORRECTION

A.I. Zimina[1*], **F.S. Senatov**[1], **N.V. Strukova**[2], **M.S. Krivozubov**[2], **M.S. Generalova**[2], **K.E. Nikitin**[2], **P.A. Orlova**[2], **T.M. Grunina**[2], **M.S. Poponova**[2], **V.G. Lunin**[2], **A.S. Karyagina**[2]

1 National University of Science and Technology MISiS, Moscow, Russia
119049, Leninsky Prospekt 4, b.1
2 Gamaleya Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia
123098, Gamalei Str., 18
**e-mail: zimina_anya@mail.ru*

A biomimetic composite material based on polylactide (PLA), polycaprolactone (PCL) and hydroxyapatite (HAP) with high biocompatibility and osteoconductive properties was developed. The structural and mechanical characteristics of the material were investigated and *in vitro* and *in vivo* studies were carried out.

Keywords: polylactide; bone implants; biomimetics; scaffold; bone regeneration.

Bone implants made of bioresorbable polymers are the optimal solution for operations in unstressed areas of the maxillofacial region. However, in addition to biocompatibility and consistency with the mechanical properties of these materials with native bone, the products must be easy to handle intraoperatively.

The well-studied biodegradable biocompatible polymers, polylactide (PLA) and polycaprolactone (PCL), were chosen as the matrix composite material. The use of a mixture of these polymers makes it possible to compensate for the disadvantages, such as PLA fragility and rigidity, as well as the low surface energy of PCL, which prevents the adhesion of cells to its surface. Hydroxyapatite (HA), a mineral constituent of bone tissue, was added to the polymer matrix to enhance its mechanical properties and bioactivity.

Films of PLA/PCL/HA with a mass ratio of 13:4:3 were produced by solvent casting. Salt (NaCl) with spherical particles of 300-500 μm was also added to To the polymer mixtureachieve the desired porosity (70% vol.), comparable to that of native bone. The dried films were thermo-pressed at 200 ºC and bulk samples were desalted in distilled water. The microstructure showed a system of open interconnected pores and uniform porosity throughout the sample. FTIR spectroscopy showed the presence of only those chemical bonds corresponding to each of the components of the composite. Young's modulus and tensile strength were 2.71 ± 0.29 and 151.38 ± 14.61 MPa, respectively, which correspond to the mechanical characteristics of bone tissue in unstressed parts of the body. It was also observed that the addition of HA had a positive effect on the change in hydrophilicity: for the PLA/PCL polymer blend, the wetting angle was 77.9 ± 2.17 º, while for the composite, it decreased to 66.2 ± 1.89 º. *In vivo* studies (carried out at Gamaleya Research Center for Epidemiology and Microbiology) on samples with bone morphogenetic protein (BMP-2) and erythropoietin (EPO), demonstrated bone growth and the absence of inflammatory reactions and. In addition, traces of osteogenesis with the formation of bone structures were observed on the samples without proteins, indicating good biocompatibility of the material even without the introduction of protein growth factors.

Thus, based on the results of physico-chemical and biological studies of the porous composite material PLA/PCL/HA, it can be concluded that medical devices based on it can be used as bone implants in unstressed areas of the body.

This work is supported by the Russian Science Foundation (grant no. 21-73-20205)

УДК 611.013.7:591.016 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-33-34

МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ И КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО КАРКАСА ИЗ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА КАК ОСНОВЫ РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ

Кондратенко А.А., Калюжная Л.И., Соколова М.О., Чернов В.Е.

Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия
194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6
e-mail: kondraa24@gmail.com

Методами микроскопического анализа оценен состав и структура тканеинженерного каркаса из пуповины человека. Выявлены сохранность компонентов и микроструктура, определяющие регенеративные свойства бесклеточного биоскаффолда.

Ключевые слова: бесклеточный биоскаффолд, матрикс, каркас, раневое покрытие.

Поиск материалов для создания биоинженерных конструкций с регенеративными свойствами является актуальной задачей тканевой инженерии.

Постнатальное образование грубых рубцов, стягивание краев раны обусловлено ориентацией миофибробластов вдоль главной оси деформации и синтезом ими коллагеновых волокон. Известно, что изначально клетки рекрутируются структурой каркаса, в дальнейшем ремоделируя его. Волокна более грубых постнатальных коллагенов диаметром 2,0-2,7 мкм беспорядочно ориентированы в пространстве, пересекаясь под почти прямым углом, подобно матриксу дермы; диаметр пор ксеногенных каркасов 20-125 мкм [1, 2]. Фетальный фенотип биоматериала для каркаса способен обеспечить разнонаправленную ориентацию клеток и нежное рубцевание регенеративного типа.

Основу тканеинженерного каркаса из пуповины составляют коллагены и гликозаминогликаны (GAG). Сохранность компонентов базальных мембран – коллагена IV типа и ламинина – были подтверждены иммуногистохимическим маркированием. Обилие молекул несульфатированных GAG,связывающихся с клеточными рецепторами, и обеспечивающих упругость и противостояние силе сжатия, выявлено окрашиванием альциановым синим. Самосборка макромолекул матрикса в процессе изготовления тканеинженерного каркаса приводит к образованию густой сети тонких и длинных фибрилл.

Разработанный нами каркас из фетального биоматериала [3], исследованный методом сканирующей микроскопии, обладает гетеропористостью (58-280 мкм), способствующей миграции, адгезии и пролиферации фибробластов. Средний диаметр волокон коллагенов, выявленный методом трансмиссионной микроскопии, составил 1,66-1,87 мкм. Аутофлюоресценция волокон и воссоздание 3D-структуры последовательно сканированных участков методом конфокальной микроскопии выявили сетеподобную структуру поперечно исчерченных волокон коллагена.

Созданный в нашей лаборатории бесклеточный продукт из высокорегенеративного биоматериала для изготовления раневого покрытия порист, сохраняет важнейшие компоненты, присущие структуре дермы и ее базальной мембране. Экстраэмбриональный биоматериал оптимален для создания тканеинженерных продуктов благодаря компонентному составу, гомологичности происхожденияи доступности без этических ограничений.

Литература

1. *Yannas I.V., Tzeranis D.S., So P.T.C. Regeneration of injured skin and peripheral nerves requires control of wound contraction, not scar formation // Wound Repair Regen. – 2017. 25(2). pp. 177–191.*
2. *Sohutskay D. O., Buno K.P., Tholpady S.S., et al. Design and biofabrication of dermal regeneration scaffolds: role of oligomeric collagen fibril density and architecture // Regen. Med. – 2019. p. 1-18.*
3. *Калюжная Л.И., Чернов В.Е., Фрумкина А.С., Чеботарев С.В., Земляной С.В., Товпеко Д.В., Косулин А.В. Изготовление тканеинженерного бесклеточного матрикса пуповины человека // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – №1 (69). – 2020. – С.124-130.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-33-34

MICROSCOPIC ANALYSIS OF THE STRUCTURE AND COMPONENT COMPOSITION OF THE HUMAN UMBILICAL CORD TISSUE ENGINEERING SCAFFOLD AS THE BASIS OF WOUND COATING

A.A. Kondratenko, L.I. Kalyuzhnaya, M.O. Sokolova, V.E. Chernov

Military Medical Academy named after S.M. Kirov, Saint Petersburg, Russia
194044, St. Petersburg, Academician Lebedev str., 6
e-mail: kondraa24@gmail.com

The composition and structure of the human umbilical cord tissue engineering scaffold were evaluated by microscopic analysis. The preservation of the components and the microstructure that determine the regenerative properties of the cell-free bioscaffold are revealed.

Key words: cell-free bioscaffold, matrix, wound coating.

The search for materials for creating bioengineered product with regenerative properties is an urgent task of tissue engineering.

Postnatal formation of rough scars, tightening of the wound edges is caused by the orientation of myofibroblasts along the main axis of deformation and their synthesis of collagen fibers. It is known that initially the cells are recruited by the structure of the skeleton, later remodeling it. The fibers of coarser postnatal collagens with a diameter of 2-2. 7 μm are randomly oriented in space, intersecting at almost right angles, like the matrix of the dermis; the pore diameter of xenogenic scaffolds is 20-125 microns [1, 2]. The fetal phenotype of the biomaterial for manufacturing the scaffolds is able to provide a multidirectional orientation of the cells and a gentle scarring of the regenerative type.

The basis of the tissue-engineering scaffold of the umbilical cord is made up of collagens and glycosaminoglycans (GAG). The safety of the components of the basal membranes-type IV collagen and laminin - was confirmed by immunohistochemical labeling. The abundance of non-sulfated GAG molecules that bind to cellular receptors and provide elasticity and resistance to the compressive force was revealed by staining with alcyan blue. Self-assembly of matrix macromolecules in the process of fabricating a tissue-engineered scaffold leads to the formation of a dense network of thin and long fibrils.

The scaffold developed by us from fetal biomaterial [3], studied by scanning microscopy, has a heteroporosity (58-280 microns), which promotes migration, adhesion and proliferation of fibroblasts. The average diameter of the collagen fibers detected by transmission microscopy was 1.66-1.87 μm. Autofluorescence of the fibers and reconstruction of the 3D structure of sequentially scanned areas by confocal microscopy revealed a network-like structure of transversely striated collagen fibers.

Created in our laboratory, the cell-free product from a highly regenerative biomaterial for the production of a wound coating, has porosity, preserves the most important components inherent in the structure of the dermis and its basement membrane. Extraembryonic biomaterial is optimal for creating tissue-engineered products due to its component composition, homologous origin, and availability without ethical restrictions.

References

1. *Yannas I.V., Tzeranis D.S., So P.T.C. Regeneration of injured skin and peripheral nerves requires control of wound contraction, not scar formation // Wound Repair Regen. - 2017.25 (2). pp. 177-191.*
2. *Sohutskay D. O., Buno K. P., Tholpady S. S., et al. Design and biofabrication of dermal regeneration scaffolds: role of oligomeric collagen fibril density and architecture // Regen. Med. - 2019. p. 1-18.*
3. *Kalyuzhnaya L. I., Chernov V. E., Frumkina A. S., Chebotarev S. V., Zemlyanoy S. V., Tovpeko D. V., Kosulin A.V. Production of tissue-engineered cell-free matrix of the human umbilical cord // Bulletin of the Russian Military Medical Academy. – №1 (69). – 2020. – Pp. 124-130.*

УДК 54.057 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-35-36

МОДИФИКАЦИЯ ТВЕРДОФАЗНОГО МЕТОДА СИНТЕЗА ДИОПСИДА МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ ИЗ МАТЕРИАЛОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Плахотнюк Е.Д., Сенатов Ф.С., Чоудхари Р. Колесников Е.А.

Научный Исследовательский Технологический Университет «МИСиС», г. Москва, Россия
119049, Москва, Ленинский проспект, дом 4, e-mail: plaeg777@yandex.ru

Разработан модифицированный метод синтезирования диопсида для биологических применений из биоотходов.

Ключевые слова: Биокерамика, биоматериал, твердофазный синтез, регенерация костной ткани, диопсид.

Переломы костей, как лицевых, так и костей туловища и свободных нижних конечностей являются наиболее распространенными травматическими повреждениями. Восстановление переломов костей — это регенеративный процесс, который во многом повторяет биологические процессы, протекающие еще на этапе эмбрионального развития скелета. Не всегда процесс сращивания костных осколков происходит успешно, в 5–10 % случаях восстановление переломов не происходит или регенерация протекает в замедленном режиме, особенно в случае сопутствующих заболеваний, таких как диабет.

Для улучшения эффективности остеосинтеза используются биоактивные материалы в имплантатах. Главным определяющим материалов для биоактивного имплантата являет собой особенность возникновения гидрокси-карбонат апатитового (ГКА) слоя на поверхности изделия. Образующаяся фаза ГКА схожа по структуре минеральной фазе кости и имеет вид поликристаллических агломератов с включенными в них коллагеновыми фибриллами, протеогликанами и гликозаминогликанами. Гидроксиапатит и трикальцийфосфат наиболее известные материалы такого рода. Диопсид - силикатная биокерамика, которая не уступает другим биокерамикам по прикладным свойствам и имеет преимущество в части синтезирования.

Диопсид может быть синтезирован несколькими методами: метод Золь-Гель, соосаждение и твердофазный метод и др. При методах Золь-Гель и соосаждения используют сложные токсичные химикаты, которые усложняют сам процесс и делают его опасным для здоровья. В твердофазном методе не используются токсичные химикаты, делая его более безопасным, быстрым и простым на практике.

В представляемом модифицированном методе синтезирования диопсида в качестве источника элементов для синтеза используется рисовая шелуха и яичная скорлупа. Рисовая шелуха предварительно обрабатывается слабыми кислотами и после подвергается тепловой обработке. Яичная скорлупа подвергается тепловой обработке и измельчается. Полученные прекурсоры смешиваются с оксидом магния в шаровой мельнице. Благодаря дополнительной обработке в шаровой мельнице, процесс синтезирования диопсида сокращается по времени.

Используя модифицированный твердофазный метод с применением биоотходов как источника элементов для синтеза, был получен диопсид с размером частиц 2-15 мкм. Оптимизирован процесс синтеза диопсида за счет уменьшения температуры и времени кальцинирования. Оптимизация возможна путем уменьшения времени кальцинирования при 1000 °C и 1100 °C. Предложенный метод синтеза позволяет получать микрочастицы диопсида с развитой поверхностью, что является благоприятным для биомедицинских применений.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №21-73-20205)

UDC 54.057 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-35-36

MODIFICATION OF THE SOLID-PHASE METHOD FOR THE SYNTHESIS OF MEDICAL DIOPSIDE FROM MATERIALS OF BIOLOGICAL ORIGIN

E.D. Plakhotnyuk, F.S. Senatov, R. Choudhary, E.A. Kolesnikov

Scientific Research Technological University "MISIS", Moscow, Russia
4 Leninsky Prospekt, Moscow, 119049, Russia, e-mail: plaeg777@yandex.ru

A modified method for synthesis of diopside for biological applications from biowaste was developed.

Key words: bioceramics, biomaterial, solid-phase synthesis, bone tissue regeneration, diopside.

Fractures of bones, both facial bones and bones of the trunk and free lower extremities, are the most common traumatic injuries. Bone fracture repair is a regenerative process that largely replicates the biological processes that take place during the embryonic development of the skeleton. The process of bone fragment fusion is not always successful; in 5-10% of cases, fracture repair does not occur or regeneration is delayed, especially in the case of concomitant diseases such as diabetes.

Bioactive materials in implants are used to improve the effectiveness of osteosynthesis. The main determinant of bioactive implant materials is the peculiarity of the appearance of the hydroxy-carbonate apatite (HCA) layer on the surface of the product. The formed HCA phase is similar by its structure to the bone mineral phase and looks like polycrystalline agglomerates with collagen fibrils, proteoglycans and glycosaminoglycans included in them. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate are the best known materials of this kind. Diopside is a silicate bioceramic that is on par with other bioceramics in terms of applied properties and has an advantage in terms of synthesis.

Diopside can be synthesized by several methods: sol-gel method, coprecipitation and solid-phase method, etc. The sol-gel and coprecipitation methods use complex toxic chemicals that complicate the process and make it hazardous to health. The solid-phase method does not use toxic chemicals, making it safer, faster and easier to practice.

The modified method presented for synthesizing diopside uses rice hulls and eggshells as a source of elements for the synthesis. Rice husks are pretreated with weak acids and then subjected to heat treatment. The eggshells are heat treated and ground. The resulting precursors are mixed with magnesium oxide in a ball mill. Due to the additional processing in the ball mill, the synthesis process of diopside is shortened in time.

Using a modified solid-phase method using biowaste as a source of elements for the synthesis, diopside with a particle size of 2-15 μm was obtained. The process of diopside synthesis was optimized by reducing the temperature and calcination time. Optimization is possible by reducing the calcination time at 1000 °C and 1100 °C. The proposed method of synthesis allows to obtain diopside microparticles with developed surface, which is favorable for biomedical applications.

The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (Project No. 21-73-20205).

УДК 606 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-36-38

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИОННО-ТРЕКОВЫХ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭФИРОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИСКУССТВЕННОЙ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Серпионов Г.В., Петрова Д.В., Кошлань И.В., Нечаев А.Н.

Международная межправительственная организация Объединенный институт ядерных исследований (ОИЯИ), Дубна, Россия
г. Дубна, Российская Федерация, 141980, Жолио-кюри, д. 20, ЛЯР НХП, fr33zzz@mail.ru

В настоящее время одной из быстро развивающихся областей применения полимерных матриц, или скаффолдов, является тканевая инженерия. Использование ионно-трековых технологий с целью создания скаффолдов для культивации различных клеточных популяций может открыть новые возможности в фундаментальной клеточной биологии и практической восстановительной медицине.

Ключевые слова: ионно-трековые мембраны и технологии, тканевая инженерия, фибробласты, ожоговая терапия.

Пористые полупроницаемые мембраны являются неотъемлемыми компонентами коммерческих многокамерных искусственных систем культивации клеток (трансвелл-системы), которые используются в фундаментальных биологических исследованиях [1]. Ионно-трековые матрицы могут быть использованы для создания искусственных тканей с определенными апикальными и базолатеральными поверхностями, что может иметь решающее значение для восстановления тканевых барьеров [2]. Одним из перспективных направлений применения ионно-трековых мембран в практической медицине является терапия ожогов и трофических язв.

Целью настоящей работы является исследование влияния химического состава и структурных параметров ионно-трековых мембран на основе полиэфирных пленок на выживаемость и скорость роста клеток фибробластов животного происхождения.

Для проведения исследований были выбраны трековые мембраны из полиэфиров (полиэтилентерефталата – ПЭТФ), поликарбоната – ПК, полиэтиленнафталата – ПЭНФ), полученные облучением полиэфирных пленок тяжёлыми ионами ксенона на циклотроне ИЦ-100 (ЛЯР ОИЯИ) и последующего щелочного гидролиза [3,4]. В ходе исследования по изучению влияния химического состава и структурных параметров ионно-трековых мембран из ПЭТФ, ПЭНФ, ПК на выживаемость клеток фибробластов китайского хомячка было установлено: среднее значение общего количества выросших колоний клеток фибробластов китайского хомячка, выраженное в процентах имеет близкие значения – 31,5%, 32,6%, 35,7% соответственно; средние значения долей больших колоний – 2,1%, 3,85%, 4,85%, соответственно. Наибольший показатель выживаемости клеток фибробластов получен для мембран из поликарбоната. Наибольшая скорость роста клеток фибробластов продемонстрирована для ПЭТФ и ПЭНФ мембран. В работе представлена электронная микроскопия поверхности полиэфирных мембран с растущими на ней фибробластами, свидетельствующая об их прикреплении и пролиферации на ионно-трековых адгезивных поверхностях. Дополнительно проведены исследования о влиянии диаметра пор коммерчески выпускаемых трековых мембран на основе полиэфиров на рост и выживаемость фибробластов. Установлено что наибольшие показатели роста и выживаемости клеток достигаются для мембран с размером пор от 0,025 до 0.1 мкм. Таким образом, трековые мембраны на основе широкого спектра полиэфиров могут быть использованы с целью создания адгезивных поверхностей для культивации фибробластов и получения искусственной соединительной ткани.

Литература

1. *Kim H.J., Huh D., Hamilton G., Ingber D. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow // Lab. Chip. 2012. V. 12. P. 2165-74.*
2. *Chung H.H., Mireles M., Kwarta B.J., Gaborski T.R. Use of Porous membranes in tissue barrier and co-culture models // Lab Chip. 2018. V. 18. P. 1671–1689.*
3. *Apel P.U. Track etching technique in membrane technology // Radiation Measurements. 2001. V. 34. P. 559-566.*
4. *Apel P.U. Ion-Track Membranes and Their Use in Biological and Medical Applications // Intern. Symp. on Ex. N. Proceedings held at Khanty-Mansiysk, 2006, Russia, 17-22 July 2006. V. 912. p.488-494.*

UDC 606 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-36-38

THE POSSIBILITY OF USING ION-TRACK MATRICES BASED ON POLYESTERS TO CREATE ARTIFICIAL CONNECTIVE TISSUE

G.V. Serpionov, D.V. Petrova, I.V. Koshlan, A.N. Nechaev

International Intergovernmental Organization Joint Institute for Nuclear Research (JINR), Dubna, Russia
Dubna, Russian Federation, 141980, Joliot-curie, 20, LAR NHP, fr33zzz@mail.ru

Currently, one of the rapidly developing applications of polymer matrices, or scaffolds, is tissue engineering. The usage of ion-track technologies to create scaffolds for the cultivation of various cell populations can open up new opportunities in fundamental cell biology and practical regenerative medicine.

Keywords: ion-track membranes and technologies, tissue engineering, fibroblasts, burn therapy.

Porous semi-permeable membranes are integral components of commercial multi-chamber artificial cell culture systems (transwell systems) used in basic biological research [1]. Ion-track matrices can be used to develop artificial tissues with specific apical and basolateral surfaces, which can be crucial for restoring such tissue barriers [2]. One of the promising application areas of track-etched membranes in practical medicine is the treatment of burns and trophic ulcers.

This work aims to study the influence of polyester ion-track membranes' chemical composition and structural parameters on animal fibroblast cells' survival and growth rate.

Track-etched membranes based on polyesters (polyethylene terephthalate – PET, polycarbonate – PC, polyethylene naphthalate – PENF) were selected for the research. These membranes were obtained by

irradiation of polyester films with heavy xenon ions on the IC-100 cyclotron (JINR FLNR) and subsequent alkaline hydrolysis. [3,4]. The influence of the chemical composition and structural parameters of the ion-track membranes made from PET, PENF, PC on the survival of Chinese hamster fibroblast cells was investigated. The results are the following: the average value of the total number of grown colonies of Chinese hamster fibroblast cells, expressed as a percentage, has similar values - 31.5%, 32.6%, 35.7%, respectively; the average values of the proportion of large colonies – 2,1%, 3,85%, 4,85%, respectively. Polycarbonate membranes showed the highest survival rate of fibroblast cells, while PET and PENF membranes demonstrated the highest growth rate of fibroblast cells. The paper presents electron microscopy of the polyester membranes surface with fibroblasts growing on it, which indicates their attachment and proliferation on the ion-track adhesive surfaces.

Additionally, this work studies the effect of the pore diameter of commercially available polyester-based track-etched membranes on the growth and survival of fibroblasts. It was found that the highest rates of cell growth and survival were achieved for the membranes with pore sizes from 0.025 to 0.1 microns. Thus, track-etched membranes based on a wide range of polyesters can be used to create adhesive surfaces for the cultivation of fibroblasts and the production of artificial connective tissue.

References

1. *Kim H.J., Huh D., Hamilton G., Ingber D. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow // Lab. Chip. 2012. V. 12. P. 2165-74.*
2. *Chung H.H., Mireles M., Kwarta B.J., Gaborski T.R. Use of Porous membranes in tissue barrier and co-culture models // Lab Chip. 2018. V. 18. P. 1671–1689.*
3. *Apel P.U. Track etching technique in membrane technology // Radiation Measurements. 2001. V. 34. P. 559-566.*
4. *Apel P.U. Ion-Track Membranes and Their Use in Biological and Medical Applications // Intern. Symp. on Ex. N. Proceedings held at Khanty-Mansiysk, 2006, Russia, 17-22 July 2006. V. 912. p.488-494.*

УДК 57.083.3 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-38-40

НОВЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ МАГНЕТИТА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

Таранова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук
Москва, Россия, 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33
e-mail: taranovana@gmail.com

Синтезированы и охарактеризованы композиционные наночастицы на основе магнетита с различными покрытиями. Сопоставлена их эффективность в качестве маркеров для иммунохроматографического определения тропонина Т, диагностического индикатора острого инфаркта миокарда.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, комплексы наночастица-белок, проточные системы, концентрирование, иммунохроматография,

Востребованность наночастиц как носителей и маркеров в аналитических системах определяется возможностью использовать их большую суммарную поверхность, чтобы ускорить специфические взаимодействия и увеличить количество детектируемого продукта. Эффективны в этом качестве растворы магнитных наночастиц (МНЧ) – коллоидные препараты кластеров металлов или их оксидов, способных перемещаться в магнитном поле. МНЧ могут быть использованы как для концентрирования аналитических реагентов, так и для выявления специфических комплексов. В связи с этим представляет интерес применение МНЧ в иммунохроматографическом анализе (ИХА) для повышения его чувствительности при сохранении экспрессности и простоты проведения. В работе рассматриваются возможности с помощью МНЧ снизить предел детекции ИХА тропонина Т, высвобождение которого из сердечной мышцы в кровоток является эффективным диагностическим индикатором острого инфаркта миокарда.

Наночастицы магнетита (Fe_3O_4) были получены восстановлением солей железа ($FeCl_2$ и $FeCl_3$) щелочными растворами. Полученные частицы очищали осаждением в магнитном поле. Далее проводились

модификации МНЧ для их стабилизации и/или контрастирования. В качестве модифицирующих покрытий были использованы: олеиновая кислота, тетраэтилортосиликат и аминопропилтриэтоксисилан. Для интенсификации окраски МНЧ с кремниевой оболочкой были дополнительно модифицированы наночастицами золота.

По данным просвечивающей электронной микроскопии частицы магнетита имели диаметр 31±4 нм и формировали агрегаты и цепочки длиной до 100 нм. Функционализированные МНЧ характеризовались следующими размерами: Fe_3O_4@олеиновая кислота – 91±3 нм; Fe_3O_4@SiO2 – 98±15 нм; Fe_3O_4@APTES – 38±15 нм; Fe_3O_4@Au – >100 нм.

Методами физической адсорбции и ковалентной иммобилизации получены конъюгаты МНЧ с антителами к тропонину Т. Данные о размерах наночастиц позволили оценить количество антител, иммобилизованных на их поверхности. Установлено, что на поверхности МНЧ иммобилизуется от 26±4 до 78±3% добавляемых антител. При этом независимо от способа иммобилизации достигается один и тот же максимальный уровень связывания антител. МНЧ с иммобилизованными в условиях насыщения антивидовыми антителами связывает из раствора до 46±5% антигена.

Изучено применение полученных конъюгатов в иммунохроматографическом анализе. Для разных вариантов покрытия сопоставлены полнота элюции, скорость движения по мембранам тест-полоски и эффективность иммунных взаимодействий. Показано, что основное преимущество применения в анализе МНЧ определяется концентрированием с их помощью аналитов из больших объемов проб. Показана возможность увеличения концентрации связанных антигенов в 10 раз с соответствующим снижением предела обнаружения аналита.

Предел детекции тропонина Т с помощью нативных МНЧ составил 100 нг/мл, с помощью Fe_3O_4@олеиновая кислота – 300 нг/мл, Fe_3O_4@SiO_2 – 1 нг/мл, Fe_3O_4@Au – 10 нг/мл. Кремниевые покрытия МНЧ позволили снизить степень агрегирования наночастиц и повысить чувствительность ИХА тропонина Т.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (Соглашение № 20-73-00325).

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-38-40

NEW COMPOSITE MAGNETITE NANOPARTICLES FOR USE IN IMMUNOCHROMATOGRAPHIC

N.A. Taranova, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect 33, 119071 Moscow, Russia
e-mail: taranovana@gmail.com

Composite nanoparticles based on magnetite with various coatings have been synthesized and characterized. Their effectiveness as markers for the immunochromatographic determination of troponin T, a diagnostic indicator of acute myocardial infarction, was compared.

Key words: magnetic nanoparticles, nanoparticle-protein complexes, flow systems, concentration, immunochromatography,

The demand for nanoparticles as carriers and markers in analytical systems is determined by the use of their large total surface. Solutions of magnetic nanoparticles (MNPs) - colloidal preparations of clusters of metals or their oxides capable of moving in a magnetic field - are effective in this capacity. MNPs can be used both for the concentration of analytical reagents and for standard complexes. In this regard, it is of interest to use MNPs in immunochromatographic analysis (ICA) to increase its sensitivity while maturing its expressiveness and simplicity. This work investigates the possibility of using MNPs to limit the detection limit of ICA troponin T, the release of which from the heart muscle into the bloodstream is an effective diagnostic indicator of acute myocardial infarction.

Magnetite nanoparticles (Fe_3O_4) were obtained by reduction of iron salts ($FeCl_2$ and $FeCl_3$) with alkaline solutions. The resulting particles were purified by deposition in a magnetic field. Then the MNPs were modified to stabilize and / or contrast. The following modifying coatings were used: oleic acid, tetraethylorthosilicate, and aminopropyltriethoxysilane. To intensify the color of MNPs with a silicon shell, gold nanoparticles were modified.

According to transmission electron microscopy, magnetite particles had a diameter of 31 ± 4 nm and formed aggregates and chains up to 100 nm in length. The functionalized MNPs were characterized by nm sizes: Fe_3O_4 @ oleic acid - 91 ± 3; Fe_3O_4 @ SiO_2 - 98 ± 15 nm; Fe_3O_4 @ APTES - 38 ± 15 nm; Fe_3O_4 @ Au -> 100 nm.

Conjugates of MNPs with antibodies to troponin T were obtained by physical adsorption and covalent immobilization. Data on the size of nanoparticles made it possible to estimate the amount of antibodies immobilized on their surface. It was found that from 26 ± 4 to 78 ± 3% of the added antibodies are immobilized on the MNP surface. In this case, regardless of the immobilization method, the same maximum level of antibody binding is achieved. MNPs with anti-species antibodies immobilized under saturation conditions bind the solution to 46 ± 5% of the antigen.

The use of the obtained conjugates in immunochromatographic analysis was studied. For different coating options, the completeness of elution, the speed of movement across the membranes of the test strip and the effectiveness of immune interactions. It is shown that the advantage of using MNPs in the analysis is determined by the concentration of their analytes from large sample volumes. The degree of concentration of the analyte using MNPs was assessed by enzyme immunoassay using conjugates of particles with anti-species antibodies. The possibility of increasing the corresponding antigens by a factor of 10 with decreasing the detection limit of the analyte has been shown.

The detection limit for troponin T with native MNPs was 100 ng / ml, with Fe_3O_4 @ oleic acid - 300 ng / ml, Fe_3O_4 @ SiO_2 - 1 ng / ml, Fe_3O_4 @ Au - 10 ng / ml. Silicon coatings of MNPs made it possible to reduce the degree of aggregation of nanoparticles and increase the sensitivity of ICA troponin T.

This work was supported by the financial support of the Russian Science Foundation (Agreement No. 20-73-00325).

УДК 604.2:547.458; 674.812.2. DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-40-41

БИОКОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМИ И ГЕМОСТАТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Упыркина Е.С., Корякова К.А., Батайкина В.А., Маврина А.С., Лияськина А.Ю., Тюшева А.Э., Ревин В.В.

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва, Саранск, Россия
430005, Саранск, Большевистская 68
e-mail: katyusha.hazova@yandex.ru

Получены биокомпозиционные материалы с антибактериальными и гемостатическими свойствами на основе нативной и окисленной бактериальной целлюлозы и фузидина натрия в форме гидрогелей и аэрогелей.

Ключевые слова: биокомпозиционные материалы, бактериальная целлюлоза, гидрогели, аэрогели

Бактериальная целлюлоза (БЦ) является перспективным материалом для получения биокомпозиционных материалов широкого спектра применения [1]. Она имеет большой потенциал использования в медицине как биоматериал для тканевой инженерии, создания раневых покрытий и трансдермальных терапевтических систем. Однако в нативном состоянии она не проявляет антимикробных свойств. Для получения материалов с антибактериальными свойствами использовался антибиотик фузидин натрия, который привлекает все больший интерес как альтернатива для лечения кожных инфекций, вызванных MRSA штаммами. Объектом эксперимента была БЦ, продуцируемая бактерией *Komagataeibacter sucrofermentans* B-11267 [2,3] и TEMPO окисленная БЦ (ОБЦ) [4]. Были получены биокомпозиционные материалы с антибактериальными и гемостатическими свойствами в форме гидрогелей и аэрогелей на основе БЦ, ОБЦ и фузидина натрия. Изучены структура, физико-химические и физико-механические свойства полученных материалов методами ИК-, ЯМР-спектроскопии, сканирующей электронной микроскопии, рентгено-структурного анализа и т.д. Показано, что полученные биокомпозиты обладают низкой цитотоксичностью и являются перспективными кандидатами для получения раневых покрытий и использования в тканевой инженерии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 19-515-80002 \ 20).

Литература

1. *Ревин В.В., Лияськина Е.В. Биотехнология бактериальных экзополисахаридов : учеб. пособие. Саранск : Изд-во Мордов. ун-та, 2019. 192 с.*
2. *Revin V. V., Liyas'kina E. V., Sapunova N. B., Bogatyreva A. O. Isolation and characterization of the strains producing bacterial cellulose. Microbiology. 2020. Vol. 89. № 1. P. 86–95.*
3. *Патент РФ № 2523606, 27.05.2014.*
4. *Revin V.V., Nazarova N.B., Tsareva E.E., Liyaskina E.V., Revin V.D., Pestov N.A. Production of Bacterial Cellulose Aerogels With Improved Physico-Mechanical Properties and Antibacterial Effect // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. Vol. 8. P. 603407.*

UDC 604.2:547.458; 674.812.2. DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-40-41

BIOCOMPOSITE MATERIALS WITH ANTIBACTERIAL AND HEMOSTATIC PROPERTIES BASED ON BACTERIAL CELLULOSE

E.S. Upyrkina, K.A. Koryakova, V.A. Bataykina, A.S. Mavrina, A.Y. Liyaskina, A.E. Tyusheva, V.V. Revin

National Research Mordovia State University, Saransk, Russia.
68 Bolshevistskaya Str., 430005, Saransk
e-mail: katyusha.hazova@yandex.ru

Biocomposite materials with antibacterial and hemostatic properties based on native and oxidized bacterial cellulose and sodium fusidine in the form of hydrogels and aerogels were obtained.

Keywords: biocomposite materials, bacterial cellulose, hydrogels, aerogels

Bacterial cellulose (BC) is a promising material for the production of biocomposite materials of a wide range of applications [1]. It has a great potential for use in medicine as a biomaterial for tissue engineering, wound dressing and transdermal therapeutic systems. However, in the native state, it does not show antimicrobial properties. To obtain materials with antibacterial properties, the antibiotic sodium fusidine was used, which is attracting increasing interest as an alternative for the treatment of skin infections caused by MRSA strains. The object of the experiment was BC produced by the bacterium *Komagataeibacter sucrofermentans* B-11267 [2, 3] and TEMPO oxidized BC (OBC) [4]. Biocomposition materials with antibacterial and hemostatic properties in the form of hydrogels and aerogels based on BC, OBC and sodium fusidine were obtained. The structure, physico-chemical and physico-mechanical properties of the obtained materials have been studied by IR and NMR spectroscopy, scanning electron microscopy, X-ray structural analysis, etc. It is shown that the obtained biocomposites have low cytotoxicity and are promising candidates for obtaining wound dressing and use in tissue engineering.

The work was financed by Russian Foundation for Basic Research (grant 19-515-80002\20).

References

1. *Revin V.V., Liyaskina E.V. Biotechnology of bacterial exopolysaccharides : textbook. Saransk : Publishing house of Mordov. un-ty, 2019. 192 p.*
2. *Revin V. V., Liyas'kina E. V., Sapunova N. B., Bogatyreva A. O. Isolation and characterization of the strains producing bacterial cellulose // Microbiology. 2020. Vol. 89. № 1. P. 86–95.*
3. *Patent RU № 2523606, 27.05.2014.*
4. *Revin V.V., Nazarova N.B., Tsareva E.E., Liyaskina E.V., Revin V.D., Pestov N.A. Production of Bacterial Cellulose Aerogels With Improved Physico-Mechanical Properties and Antibacterial Effect // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. Vol. 8. P. 603407.*

УДК 543.068.8:543.63 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-42-44

МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ПМО ТЕТРАЦИКЛИНА – СИНТЕЗ И ПРИМЕНЕНИЕ В ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СЕНСОРАХ

Бизина Е.В., Фарафонова О.В., Ермолаева Т.Н.

Липецкий государственный технический университет, Липецк, Россия
398055, ул. Московская, д. 30
ov.farafonova@yandex.ru

Синтезированы магнитные полимеры с молекулярными отпечатками тетрациклина. Изучены условия формирования распознающего слоя пьезоэлектрического сенсора на основе частиц Fe_3O_4@ПМО. Показано, что применение разработанного наноматериала позволяет сократить время подготовки сенсора к анализу в 25 раз по сравнению с традиционными способами.

Ключевые слова: полимеры с молекулярными отпечатками, метод «ядро-оболочка», пьезоэлектрический сенсор, тетрациклин, магнитные наночастицы.

Полимеры с молекулярными отпечатками (ПМО), синтезируемые методом «ядро-оболочка» («core-shell» или «core-shell by grafting») уже положительно зарекомендовали себя как селективные сорбенты для концентрирования и разделения различных органических соединений. При этом достигается сферическая форма ядра и повышается степень дисперсности синтезируемых частиц Fe_3O_4@ПМО, имеющих однородную морфологию поверхности, а также молекулярные отпечатки концентрируются в довольно тонком слое, что ускоряет повторное связывание с шаблоном. В пьезоэлектрических сенсорах такие наночастицы практически не применяются, несмотря на то, что магнитные наносферы Fe_3O_4@ПМО, полученные методом поверхностного импринтинга могут существенно расширить аналитические возможности сенсоров, упростить процедуру формирования распознающего слоя и повысить его устойчивость.

Синтезированы магнитные полимеры с молекулярными отпечатками тетрациклина. Предварительно получали магнитные частицы Fe_3O_4 по модифицированному методу соосаждения Массарта, включающему растворение 0.02 моль $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ и 0.03 моль $Fe_2(SO_4)3 \cdot 9H_2O$ в 100 см^3 дистиллированной воды, с последующим введением 2.0 см^3 олеиновой кислоты и ультразвуковой обработкой. Далее к раствору по каплям добавляли раствор аммиака и нагревали до температуры 60°С. После этого вводили по каплям еще одну порцию олеиновой кислоты для поверхностной гидрофобизации частиц и выдерживали в течение 1 ч при температуре 80°С при постоянном перемешивании. Затем магнитный осадок отделяли, последовательно промывали водой и этанолом и высушивали при комнатной температуре.

Для получения «оболочки» к предварительно суспендированным магнитным наночастицам Fe_3O_4 в 1 см^3 толуола добавляли 0.1 ммоль шаблона (тетрациклина гидрохлорид) и 0.4 ммоль метакриловой кислоты и оставляли при температуре 4°С. Далее в полученную систему вводили кросс-реагент этиленгликольдиметакрилат и инициатор полимеризации 2,2-изо-бис-изобутиролнитрил и гомогенизировали систему путем ультразвуковой обработки. К полученному раствору по каплям добавляли водный раствор поливинилпирролидона (25 мг/см^3) и проводили полимеризацию при 60 °С при постоянном перемешивании в течение 4 ч. По аналогичной методике, но без добавления тетрациклина в процессе синтеза, были получены неимпринтированные магнитные частицы – Fe_3O_4@НИП.

Методом турбидиметрии оценены размеры магнитного ядра, молекулярно импринтированных (Fe_3O_4@ПМО) и неимпринтированных (Fe_3O_4@НИП) магнитных сферических наночастиц. Было установлено, что средний радиус магнитных ядер Fe_3O_4 составляет 65±3 нм, магнитных частиц Fe3O4@ПМО – 93±4 нм, а Fe_3O_4@НИП – 127±6 нм. Таким образом, толщина поверхностного полимерного слоя Fe3O4@ПМО – 28±5 нм, а Fe_3O_4@НИП – 62±8 нм. Увеличение толщины полимерного слоя неимпринтированных частиц может быть объяснено влиянием молекул темплата на процессы полимеризации. Полученные результаты коррелируют с размерами наночастиц, установленными методом АСМ.

Изучены условия формирования распознающего слоя на основе частиц Fe_3O_4@ПМО на поверхности золотого электрода сенсора под действием магнитного поля, создаваемого неодимовым магнитом. Исследовано влияние объема наносимой на поверхность пьезоэлектрического сенсора суспензии Fe_3O_4@ПМО на воспроизводимость результатов изменения массы распознающего слоя. Как показали экспериментальные данные, максимальная воспроизводимость аналитического сигнала достигается при нанесении на поверхность сенсора 3 мм^3 суспензии Fe_3O_4@ПМО. Методом пьезокварцевого микровзвешивания оценена поверхностная концентрация молекулярных отпечатков и устойчивость распознающего слоя на

основе магнитных частиц Fe_3O_4@ПМО тетрациклина.

Оценена возможность регенерации распознающего слоя пьезоэлектрического сенсора после каждого цикла измерений. В качестве регенерирующих растворов применяли дистиллированную воду, раствор уксусной кислоты и этанола в дистиллированной воде, а также раствор ацетонитрила и этанола в дистиллированной воде. Показано, что использование в качестве регенерирующего раствора уксусной кислоты и этанола в дистиллированной воде, взятых в объемных соотношениях 1:6:100, позволяет максимально полно извлекать тетрациклин из молекулярных отпечатков без разрушения структуры полимерного слоя. Повторное встраивание тетрациклина в отпечатки ПМО происходит в течение 6 мин.

Установлены метрологические характеристики пьезоэлектрического сенсора на основе Fe_3O_4@ПМО для определения тетрациклина: диапазон линейности составил 16-275 мкг/см^3, предел обнаружения составляет 5 мкг/см^3.

Показано, что продолжительность формирования распознающего слоя сенсора на основе Fe_3O_4@ПМО сокращается до 70 мин, что в 25 раз меньше по сравнению с традиционными способами иммобилизации. Пьезокварцевый сенсор на базе магнитных частиц Fe_3O_4@ПМО может быть рекомендован для выявления и определения тетрациклина в жидких средах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Липецкой области в рамках научного проекта № 20-43-480001.

UDC 543.068.8: 543.63 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-42-44

MAGNETIC MIP TETRACYCLINE NANOPARTICLES – SYNTHESIS AND APPLICATION IN PIEZOELECTRIC SENSORS

E.V. Bizina, O.V. Farafonova, T.N. Ermolaeva

Lipetsk State Technical University, Lipetsk, Russia
398055, st. Moscow, 30
ov.farafonova@yandex.ru

Magnetic polymers with tetracycline molecular imprints have been synthesized. The conditions for the formation of a recognition layer of a piezoelectric sensor based on Fe_3O_4@MIP particles have been studied. It is shown that the use of the developed nanomaterial makes it possible to reduce the time required to prepare the sensor for analysis by 25 times in comparison with traditional methods.

Key words: polymers with molecular imprints, "core-shell" method, piezoelectric sensor, tetracycline, magnetic nanoparticles.

Molecular imprinted polymers (MIP) synthesized by the core-shell method («core-shell» or «core-shell by grafting») have already proven themselves as selective sorbents for the concentration and separation of various organic compounds. In this case, a spherical shape of the core is achieved and the degree of dispersion of the synthesized Fe_3O_4@MIP particles, which have a uniform surface morphology, is increased, as well as molecular imprints are concentrated in a rather thin layer, which accelerates re-binding with the template. Such nanoparticles are practically not used in piezoelectric sensors, despite the fact that magnetic nanospheres of Fe_3O_4@MIP obtained by surface imprinting can significantly expand the analytical capabilities of sensors, simplify the procedure for forming a recognition layer, and increase its stability.

Magnetic polymers with tetracycline molecular imprints have been synthesized. Magnetic Fe_3O_4 particles were preliminarily obtained by the modified Massart coprecipitation method, which includes the dissolution of 0.02 mol $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.03 mol $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 9H_2O$ in 100 cm^3 of distilled water, followed by the introduction of 2.0 cm^3 of oleic acid and ultrasonic treatment. Next, an ammonia solution was added dropwise to the solution and heated to a temperature of 60 °C. After that, another portion of oleic acid was added dropwise for surface hydrophobization of the particles and kept for 1 h at a temperature of 80 °C with constant stirring. Then the magnetic precipitate was separated, washed sequentially with water and ethanol, and dried at room temperature.

To obtain a “shell”, 0.1 mmol of template (tetracycline hydrochloride) and 0.4 mmol of methacrylic acid were added to the pre-suspended magnetic Fe_3O_4 nanoparticles in 1 cm^3 of toluene and left at 4 °C. Then, the cross-reagent ethylene glycol dimethacrylate and the polymerization initiator 2,2-isobis-isobutyrolnitrile were introduced into the resulting system, and the system was homogenized by ultrasonic treatment. An aqueous solution of

polyvinylpyrrolidone (25 mg/cm^3) was added dropwise to the resulting solution, and polymerization was carried out at 60 °C with constant stirring for 4 h. By a similar procedure, but without adding tetracycline during the synthesis, non-imprinted magnetic particles were obtained - Fe_3O_4@NIP.

The sizes of the magnetic core, molecularly imprinted (Fe_3O_4@MIP) and non-imprinted (Fe_3O_4@NIP) magnetic spherical nanoparticles were estimated by turbidimetry. It was found that the average radius of magnetic cores of Fe_3O_4 is 65±3 nm, magnetic particles of Fe_3O_4@MIP - 93±4 nm, and Fe_3O_4@NIP - 127±6 nm. Thus, the thickness of the surface polymer layer Fe_3O_4@MIP is 28±5 nm, and the thickness of Fe_3O_4@NIP is 62±8 nm. An increase in the thickness of the polymer layer of non-imprinted particles can be explained by the influence of template molecules on the polymerization processes. The results obtained correlate with the sizes of nanoparticles determined by the AFM method.

The conditions for the formation of a recognition layer based on Fe_3O_4@MIP particles on the surface of the gold electrode of the sensor under the action of a magnetic field generated by a neodymium magnet are studied. The effect of the volume of Fe_3O_4@MIP suspension deposited on the surface of a piezoelectric sensor on the reproducibility of the results of changes in the mass of the recognition layer has been investigated. Experimental data have shown that the maximum reproducibility of the analytical signal is achieved when a 3 mm^3 Fe_3O_4@MIP suspension is applied to the sensor surface. The surface concentration of molecular imprints and the stability of the recognition layer based on magnetic particles of Fe_3O_4@MIP tetracycline were estimated by the method of piezoquartz microweighing.

The possibility of regenerating the recognition layer of the piezoelectric sensor after each measurement cycle is estimated. Distilled water, a solution of acetic acid and ethanol in distilled water, and a solution of acetonitrile and ethanol in distilled water were used as regenerating solutions. It is shown that the use as a regenerating solution of acetic acid and ethanol in distilled water, taken in volumetric ratios of 1:6:100, allows the most complete extraction of tetracycline from molecular imprints without destroying the structure of the polymer layer. Re-embedding of tetracycline into the MIP imprints occurs within 6 min.

The metrological characteristics of a piezoelectric sensor based on Fe_3O_4@MIP for the determination of tetracycline have been established: the linearity range was 16-275 μg/cm^3, the detection limit is 5 μg/cm^3.

It is shown that the duration of the formation of the recognition layer of the sensor based on Fe_3O_4@MIP is reduced to 70 min, which is 25 times less compared to traditional methods of immobilization. A piezoelectric quartz sensor based on Fe_3O_4@MIP magnetic particles can be recommended for the detection and determination of tetracycline in liquid media.

The research was funded by RFBR and Lipetsk Region, project number 20-43-480001.

УДК 615.462-036.5 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-44-46

БИОМИМЕТИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ХИРУРГИИ

Чубрик А.В., Сенатов Ф.С.

Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва, Россия
119049, г. Москва, Ленинский проспект, д. 4
e-mail: chubrix@misis.ru

Разработан биомиметический композиционный материал на основе полигидроксибутирата с добавлением гидроксиапатита. Полученный материал имитирует нативную трабекулярную костную ткань человека с точки зрения структуры и механических свойств, а также является биорезорбируемым и биоактивным, что подтверждается исследованиями *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: полигидроксибутират, гидроксиапатит, биомиметика, скаффолд, реконструктивная хирургия, биомедицина

Биомиметические материалы для реконструктивной хирургии становятся все более востребованными при необходимости восстановления костной ткани пациента после травм и болезней. Наиболее оптимальными для инженерии костной ткани являются композиционные материалы, обеспечивающие механическую поддержку и ускоряющие процесс регенерации поврежденной кости.

Одним из перспективных биорезорбируемых полимеров для реконструкции костей с механобиологической точки зрения является полигидроксибутират (ПГБ), уступающий место новообразованной костной

ткани в процессе биодеградации в среде организма [1]. Для воссоздания пористой структуры трабекулярной (губчатой) кости возможно использование порообразующего компонента (NaCl) [2, 3] при термопрессовании с последующим его удалением, регулируя размеры частиц которого, можно получать требуемые для успешной интеграции в организме пациента размер пор и пористость. Повышение биоактивности ПГБ возможно за счет использования основного минерального компонента костной ткани – гидроксиапатита (ГАП).

Разработанный биомиметический скаффолд ПГБ/15%ГАП с пористостью 70 % и преимущественным размером пор 300-500 мкм имитирует структуру и механические свойства нативной трабекулярной кости. Такая структура предпочтительна для колонизации остеобластами и васкуляризации, а микрорельеф пор привлекателен для адгезии клеток и повышает остеокондуктивные свойства материала.

Исследования *in vitro* показали, что полученные материалы не проявляют цитотоксических свойств, а пористый ПГБ/ГАП стимулирует пролиферативную активность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток. После 72 часов инкубации их становится на 20 % больше в сравнении с контролем, что было измерено по оптической плотности и при помощи автоматического счетчика клеток.

Исследования *in vivo*, при которых в краниальные дефекты критического размера мышей помещались имплантаты из пористых материалов ПГБ и ПГБ/ГАП с внесенными костным морфогенетическим белком 2 и эритропоэтином, показали активные остеогенез и рост сосудов. Практически полное восстановление костной ткани по результатам томографии наблюдалось уже на сроке в 6 недель в при использовании ПГБ/ГАП.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой перспективности использования разработанных биомиметических материалов для восстановления костной ткани, как с точки зрения структурных и механических свойств, так и высокой биоактивности.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-73-20205).

Литература

1. *Dwivedi R. et al. Poly hydroxyalkanoates (PHA): Role in bone scaffolds // Journal of oral biology and craniofacial research. – 2020. – T. 10. – №. 1. – C. 389-392.*
2. *Senatov F.S. et al. Comparative analysis of structure and mechanical properties of porous PEEK and UHMWPE biomimetic scaffolds // Materials Letters. – 2019. – T. 239. – C. 63-66.*
3. *Chubrik A. et al. Highly porous PEEK and PEEK/HA scaffolds with Escherichia coli-derived recombinant BMP-2 and erythropoietin for enhanced osteogenesis and angiogenesis // Polymer Testing. – 2020. – T. 87. – C. 106518.*

UDC 615.462-036.5 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-44-46

BIOMIMETIC MATERIALS BASED ON POLYHYDROXYBUTYRATE FOR RECONSTRUCTIVE SURGERY

A.V. Chubrik, F.S. Senatov

National University of Science and Technology MISIS, Moscow, Russia
119049, Moscow, Leninsky prospect, 4
e-mail: chubrix@misis.ru

A biomimetic composite material based on polyhydroxybutyrate with the addition of hydroxyapatite has been developed. The resulting material mimics native human trabecular bone tissue in terms of structure and mechanical properties, and is also bioresorbable and bioactive, which is confirmed by *in vitro* and *in vivo* studies.

Key words: polyhydroxybutyrate, hydroxyapatite, biomimetics, scaffold, reconstructive surgery, biomedicine

Biomimetic materials for reconstructive surgery are becoming more and more popular when it is necessary to restore the patient's bone tissue after injuries and diseases. The most optimal for bone tissue engineering are composite materials that provide mechanical support and accelerate the regeneration of damaged bone.

One of the promising bioresorbable polymers for bone reconstruction from a mechanobiological point of view is polyhydroxybutyrate (PHB), which gives way to newly formed bone tissue in the process of biodegradation in the body's environment [1]. To recreate the porous structure of trabecular (cancellous) bone, it is possible to use a pore-forming component (NaCl) [2, 3] during heat pressing followed by its removal, by adjusting the particle size of which, it is possible to obtain the pore size and porosity required for successful integration in the patient's body.

An increase in the bioactivity of PHB is possible due to the use of the main mineral component of bone tissue - hydroxyapatite (HA).

The developed biomimetic scaffold PHB/15%HA with a porosity of 70% and a predominant pore size of 300-500 microns mimics the structure and mechanical properties of the native trabecular bone. Such a structure is preferable for osteoblast colonization and vascularization, and the pore microrelief is attractive for cell adhesion and increases the osteoconductive properties of the material.

In vitro studies have shown that the obtained materials do not exhibit cytotoxic properties, and porous PHB/HA stimulates the proliferative activity of multipotent mesenchymal stromal cells. After 72 hours of incubation, they become 20% more in comparison with the control, which was measured by optical density and using an automatic cell counter.

In vivo studies, in which implants made of porous materials PHB and PHB/HA with introduced bone morphogenetic protein 2 and erythropoietin were placed in cranial defects of critical size of mice, showed active osteogenesis and vascular growth. Almost complete restoration of bone tissue according to the results of tomography was observed already at a period of 6 weeks with the use of PHB/HA.

The results obtained indicate that the use of the developed biomimetic materials for bone tissue restoration is highly promising, both from the point of view of structural and mechanical properties, and high bioactivity.

The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project No. 21-73-20205).

References

1. *Dwivedi R. et al. Poly hydroxyalkanoates (PHA): Role in bone scaffolds // Journal of oral biology and craniofacial research. – 2020. – V. 10. – №. 1. – P. 389-392.*
2. *Senatov F.S. et al. Comparative analysis of structure and mechanical properties of porous PEEK and UHMWPE biomimetic scaffolds // Materials Letters. – 2019. – V. 239. – P. 63-66.*
3. *Chubrik A. et al. Highly porous PEEK and PEEK/HA scaffolds with Escherichia coli-derived recombinant BMP-2 and erythropoietin for enhanced osteogenesis and angiogenesis // Polymer Testing. – 2020. – V. 87. – P. 106518.*

БОЛЕЗНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА: 21 ВЕК – СОСТОЯНИЕ И ЧТО НАС ОЖИДАЕТ

BRAIN DISEASES IN 21 CENTURY: STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES

1. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ КАНДИДАТНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ГУМАНИЗИРОВАННОГО АНТИТЕЛА К НЕОДЕТЕРМИНАНТЕ С3 КОМПОНЕНТА КОМПЛЕМЕНТА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТРАВМАТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА
Некрасова К.А., Трофимов А.В., Жахов А.В., Родин С.В., Горбунов Н.П., Петров А.В., Пигарева Н.В., Александров Г.В., Захаров М.С., Кирьянова А.С., Хуттунен О.Э., Бендт И.В., Крылова А.Э., Ищенко А.М. 48

PRECLINICAL STUDIES TO ASSESS ACUTE AND CHRONIC TOXICITIES OF A CANDIDATE DRUG BASED ON COMPLEMENT C3 NEODETERMINANT RECOMBINANT HUMANIZED ANTIBODY FOR TREATMENT OF TRAUMATIC BRAIN INJURIES
K.A. Nekrasova, A.V. Trofimov, A.V. Zhakhov, S.V. Rodin, N.P. Gorbunov, A.V. Petrov, N.V. Pigareva, G.V. Aleksandrov, M.S. Zakharov, A.S. Kiryanova, O.E. Khuttunen, I.V. Bendt, A.E. Krylova, A.M. Ischenko.....49

2. НОВЫЙ МЕТОД НАНОМЕХАНИЧЕСКОГО И МОРФОЛОГИЧЕСКОГО КАРТИРОВАНИЯ ТКАНЕЙ НА ПЕРЕЖИВАЮЩИХ СРЕЗАХ МОЗГА ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГЛИОМ
Фарниев В.М., Шмелев М.Е., Швед Н.А., Кумейко В.В. 50

NEW METHOD FOR NANOMECHANICAL AND MORPHOLOGICAL TISSUE MAPPING ON LIVE BRAIN SLICES FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF GLIOMA
V.M. Farniev, M.E. Shmelev, N.A. Shved, V.V. Kumeiko.....51

3. ЭВОЛЮЦИЯ ЛИПИДНОГО СОСТАВА ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА
Е.А. Стекольщикова, А.И. Ткачев, М.С. Осетрова, Д.Н. Смирнов, О.И. Ефимова, Е.Е. Храмеева 52

EVOLUTION OF THE LIPID COMPOSITION OF THE HUMAN BRAIN
E.A. Stekolshchikova, A.I. Tkachev, M.S. Osetrova, D.N. Smirnov, O.I. Efimova, E.E. Khrameeva 53

УДК 615.21 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-48-49

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ КАНДИДАТНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ГУМАНИЗИРОВАННОГО АНТИТЕЛА К НЕОДЕТЕРМИНАНТЕ С3 КОМПОНЕНТА КОМПЛЕМЕНТА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТРАВМАТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Некрасова К.А., Трофимов А.В., Жахов А.В., Родин С.В., Горбунов Н.П., Петров А.В., Пигарева Н.В., Александров Г.В., Захаров М.С., Кирьянова А.С., Хуттунен О.Э., Бендт И.В., Крылова А.Э., Ищенко А.М.

Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия 197110 Россия, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, д. 7
e-mail: k.a.nekrasova@hpb.spb.ru

Лекарственное средство на основе рекомбинантного гуманизированного антитела к неодетерминанте С3 компонента комплемента человека для лечения травматических повреждений головного мозга относится к III классу малоопасных лекарственных препаратов.

Ключевые слова: рекомбинантное антитело, С3 компонент комплемента, доклинические исследования, острая токсичность, хроническая токсичность

Ранее было проведено доклиническое изучение специфической фармакологической активности рекомбинантного гуманизированного антитела к неодетерминанте С3 компонента комплемента человека на модели свободно падающего груза у крыс с использованием его аналога - моноклонального антитела, специфичного С3 компоненту комплемента крысы. Показано, что введение высокоаффинных моноклональных антител, блокирующих активацию комплемента крысы по альтернативному пути, экспериментальным животным с черепно-мозговой травмой приводило к выраженному положительному эффекту, проявлявшемуся в сохранении когнитивных функций животных, а также в улучшении гистологической картины мозговой ткани [1].

Целью работы являлись доклинические исследования острой и хронической токсичности лекарственной формы (ЛФ) рекомбинантного гуманизированного антитела к неодетерминанте С3 компонента комплемента человека hC34.

Доклинические исследования включали исследования острой и хронической токсичности. Исследования проводили на лабораторных животных: белые беспородные мыши, белые беспородные крысы, кролики породы шиншилла. Все эксперименты проводили в соответствии со стандартами Надлежащей лабораторной практики и гуманного обращения с животными. Вся работа с животными соответствовала протоколам по использованию животных, утвержденным комиссией по биоэтике института.

Изучение острой токсичности ЛФ рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 при внутривенном введении показало, что доза в 2000 мг/кг (в 500 раз превосходящая терапевтическую дозу для человека) абсолютно не токсична для лабораторных животных (грызунов и зайцеобразных), что говорит о низкой токсичности и высокой безопасности изученного лекарственного средства при однократном применении. Оценка пирогенного и местно-раздражающего действия ЛФ рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 показала, что изученное лекарственное средство апирогенно и не оказывает местно-раздражающего действия.

Изучение хронической токсичности ЛФ рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 на крысах и кроликах показало, что дозы препарата до 500 мг/кг (в 125 раз превосходящие терапевтическую дозу для человека) при ежедневном введении в течение 30 дней абсолютно не токсичны для лабораторных животных, что говорит о высокой безопасности изученного препарата при длительном применении.

В соответствии с классификацией опасности лекарственных препаратов для клинического применения, ЛФ рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 имеет индекс безопасности > 5 и относится к III классу малоопасных лекарственных препаратов. Результаты, полученные в данном исследовании, могут быть использованы при изучении клинической безопасности кандидатного лекарственного средства на основе рекомбинантного гуманизированного антитела к неодетерминанте С3 компонента комплемента человека для лечения травматических повреждений головного мозга.

Литература

1. *Горбунов Н.П., Ищенко А.М., Жахов А.В., Трофимов А.В., Денисенко Е.С., Александров Г.В., Захаров М.С. Изучение ингибирующего действия анти С3 антител на модели черепно-мозговой травмы у крыс // Российский иммунологический журнал. – 2018. - 12(4). – С.641-643. https://doi.org/10.31857/S102872210002623-0.*

UDC 615.21 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-48-49

PRECLINICAL STUDIES TO ASSESS ACUTE AND CHRONIC TOXICITIES OF A CANDIDATE DRUG BASED ON COMPLEMENT C3 NEODETERMINANT RECOMBINANT HUMANIZED ANTIBODY FOR TREATMENT OF TRAUMATIC BRAIN INJURIES

K.A. Nekrasova, A.V. Trofimov, A.V. Zhakhov, S.V. Rodin, N.P. Gorbunov, A.V. Petrov, N.V. Pigareva, G.V. Aleksandrov, M.S. Zakharov, A.S. Kiryanova, O.E. Khuttunen, I.V. Bendt, A.E. Krylova, A.M. Ischenko

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia.
197110 Russia, St. Petersburg, Pudozhskaya street, 7
e-mail: k.a.nekrasova@hpb.spb.ru

A drug based on complement C3 neodeterminant recombinant humanized antibody for the treatment of traumatic brain injuries belongs to the class III of low-risk drugs.

Key words: recombinant antibody, C3 component of the complement, preclinical studies, acute toxicity, chronic toxicity

Previously, we carried out a preclinical study of the specific pharmacological activity of the complement C3 neodeterminant recombinant humanized antibody using a standardized weight-drop model in rats. In this study we used its analogue, a monoclonal antibody specific to the C3 component of rat complement. We showed that the administration of high-affinity monoclonal antibodies blocking the activation of rat complement via an alternative pathway to experimental animals with traumatic brain injury led to a pronounced positive effect, manifested in the preservation of the cognitive functions of animals, as well as in the improvement of the histology of the brain tissue [1].

The objective of this study was to assess acute and chronic toxicities of a dosage form (DF) of complement C3 neodeterminant recombinant humanized antibody hC34.

The experiments to assess acute and chronic toxicities were conducted. The following types of laboratory animals were used: white outbred mice, white outbred rats, rabbits. All experiments were conducted in accordance with GLP and the standards of humane treatment of animals. All the work with animals met the protocols on animal use approved by the institutional IACUC.

Study of the acute toxicity of the DF of hC34 antibody demonstrated that it was absolutely non-toxic for laboratory animals (rats and rabbits) when administered intravenously at a dose 2000 mg/kg (500 times higher than the therapeutic dose for humans). This indicates low toxicity and high safety of the studied drug at a single use. Study of the pyrogenic and local irritating effect of the DF of hC34 antibody showed that it is non-pyrogenic and does not have a local irritating effect.

The study of the chronic toxicity of the DF of hC34 antibody showed that the antibody to be absolutely non-toxic for laboratory animals (rats and rabbits) when administered at doses up to 500 mg/kg (125 times higher than the therapeutic dose for humans) daily for 30 days. This indicates high safety of the studied drug at a long-term use.

The dosage form of recombinant humanized antibody hC34 has a safety index > 5 and belongs to the class III of low-risk drugs in accordance with the classification of dangerous medical products. The data obtained in this study may be used for clinical evaluation of drug safety.

References

1. Gorbunov N.P., Ishchenko A.M., Zhakhov A.V., Trofimov A.V., Denisenko E.S., Aleksandrov G.V., Zakharov M.S. Izuchenie ingibiruyushchego deystviya anti C3 antitel na modeli cherepno-mozgovoy travmy u krys [Study of the inhibitory effect of anti-C3 antibodies in a model of traumatic brain injury in rats]. Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal [Russian journal of immunology]. 2018. No 12(4). Pp.641-643. https://doi.org/10.31857/S102872210002623-0.

УДК 57.085.19, 616-006.484.04 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-50-52

НОВЫЙ МЕТОД НАНОМЕХАНИЧЕСКОГО И МОРФОЛОГИЧЕСКОГО КАРТИРОВАНИЯ ТКАНЕЙ НА ПЕРЕЖИВАЮЩИХ СРЕЗАХ МОЗГА ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГЛИОМ

Фарниев В.М., Шмелев М.Е., Швед Н.А., Кумейко В.В.

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток Россия
690922, Приморский край, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10, корпус М
E mail: farniev.vm@dvfu.ru
устный доклад

Разработан метод наномеханического и морфологического картирования мозга с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) на переживающих срезах. Подобраны условия и параметры получения живых срезов мозга, удовлетворяющих требованиям АСМ с использованием композитного гидрогеля, установлены необходимые характеристики зондов. На переживающих срезах мозга получены карты наномеханических и морфологических характеристик нормальных тканей и глиобластомы.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, глиома, онкодиагностика, наномеханические свойства

Наномеханика клеток и тканей входит в обиход биомедицинских исследований, не только дополняя традиционное иммунофенотипирование и молекулярный анализ, но и принося новые неожиданные идеи для клинической диагностики и биоинженерии. Однако, несмотря на прогресс в изучении отдельных клеток с помощью атомно-силовой микроскопии, ее применение для картирования живых тканей имеет ряд технических ограничений.

Классические методы получения срезов тканей, в том числе с применением традиционных подходов вибратомии, не соответствуют требованиям АСМ. Мы разработали новый подход для получения и исследования переживающих срезов ткани мозга и опухолей с помощью атомно-силовой микроскопии с помощью комбинированного морфологического и наномеханического картирования в режиме сканирования с высоким разрешением, в отличие от обычно используемого режима силовой спектроскопии, основанного на применении одиночных измерений. Это стало возможным благодаря совместному использованию поддерживающей среды (заключающего матрикса) для вибратомии и модифицированных зондов для АСМ.

Состав поддерживающей среды был подобран путем регулирования количества агара и коллагена I для достижения оптимальных вязкоупругих свойств, обеспечивающих получения высококачественных живых срезов, соответствующих требованиям АСМ. В отличие от микротомии и криотомии процесс разрезания ткани на вибратоме в среде такого типа значительно меньше повреждает нативную структуру и не вызывает критической деформации биоматериала запредельными нагрузками сжатия и растяжения.

Зонды АСМ были специально приспособлены для живой ткани с помощью фемтосекундной лазерной абляции под контролем сканирующей электронной микроскопии. Аблированные зонды сравнивали со стандартными клеточными зондами и кантилеверами, модифицированными аппликацией микрочастиц, для демонстрации их хорошей разрешающей способности и других характеристик.

Разработанная методика занимает всего 30 минут и может быть совмещена с применением витальных клеточных трейсеров или иммунофенотипирования, что может в перспективе использоваться в различных областях, например, в интраоперационной диагностике.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №20-15-00378.

Литература

Andolfi L. et al. Investigation of adhesion and mechanical properties of human glioma cells by single cell force spectroscopy and atomic force microscopy //PLoS one. – 2014. – Т. 9. – №. 11. – С. e112582.

Lekka M. et al. Cancer cell detection in tissue sections using AFM //Archives of biochemistry and biophysics. – 2012. – Т. 518. – №. 2. – С. 151-156.

Grunow B. et al. Histochemistry on vibratome sections of fish tissue: a comparison of fixation and embedding methods //Aquatic Biology. – 2015. – Т. 23. – №. 3. – С. 251-263.

Stewart D. C. et al. Mechanical characterization of human brain tumors from patients and comparison to potential surgical phantoms //PloS one. – 2017. – Т. 12. – №. 6. – С. e0177561.

Tsitlakidis A. et al. Atomic Force Microscope Nanoindentation Analysis of Diffuse Astrocytic Tumor Elasticity: Relation with Tumor Histopathology //Cancers. – 2021. – T. 13. – №. 18. – C. 4539.

Bouchonville N. et al. AFM mapping of the elastic properties of brain tissue reveals kPa μm− 1 gradients of rigidity // Soft Matter. – 2016. – T. 12. – №. 29. – C. 6232-6239.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-50-52

NEW METHOD FOR NANOMECHANICAL AND MORPHOLOGICAL TISSUE MAPPING ON LIVE BRAIN SLICES FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF GLIOMA

V.M. Farniev, M.E. Shmelev, N.A. Shved, V.V. Kumeiko

Far Eastern Federal University, Vladivostok Russia
690922, Primorsky Territory, Vladivostok, Russian island, Ajax village, 10, building M
E mail: farniev.vm@dvfu.ru
Oral presentation

Method for nanomechanical and morphological mapping of the brain using atomic force microscopy (AFM) on live slices has been developed. The conditions and parameters for obtaining live brain slices that meet the requirements of AFM using a composite hydrogel have been selected, and the necessary characteristics of the probes have been established. On the live brain slices, maps of nanomechanical and morphological characteristics of normal tissues and glioblastoma were obtained.

Key words: atomic force microscopy, glioma, oncology diagnostics, nanomechanical properties

Cell and tissue nanomechanics are intriguingly introduced into biomedical research, not only complementing traditional immunophenotyping and molecular analysis, but also bringing unexpected new insights for clinical diagnostics and bioengineering. However, despite the progress in the study of individual cells by atomic force microscopy, its application for mapping live tissues has a number of technical limitations.

Classical methods of obtaining tissue sections, including those using traditional approaches of vibratomy, do not meet the requirements of AFM. We have elaborate a new approach for obtaining and examining live sections of brain tissue and tumors using atomic force microscopy by means of combined morphological and nanomechanical mapping in high resolution scanning mode, in contrast to typically utilised force spectroscopy mode, based on single-point probe application. This became possible due to the combined use of an supporting medium (embedding matrix) for vibratomy and originally modified AFM probes.

The embedding matrix composition was carefully created by regulating the amounts of agar and collagen I to reach optimal viscoelastic properties for obtaining high-quality live slices that meet AFM requirements. Process of tissue slicing in such type of matrix using vibratome do much less damage to native structure and avoid critical deformation of the biomaterial by the extreme loads of compression and tension. in contrast to microtomy and cryotomy.

AFM probes were specially fitted using a femtosecond laser ablation under the control of scanning electron microscopy. Fitted probes were compared with standard cell probes and cantilevers modified with microparticles application, showing good resolution and other characteristics.

Developed technique takes only 30 minutes and could be combined with vital cell tracer analysis or immunophenotyping what in perspective can be applied in other related areas, for example, in intraoperative diagnostics.

This work was supported by a grant from the Russian Science Foundation No. 20-15-00378.

References

Andolfi L. et al. Investigation of adhesion and mechanical properties of human glioma cells by single cell force spectroscopy and atomic force microscopy //PLoS one. – 2014. – T. 9. – №. 11. – C. e112582.

Lekka M. et al. Cancer cell detection in tissue sections using AFM //Archives of biochemistry and biophysics. – 2012. – T. 518. – №. 2. – C. 151-156.

Grunow B. et al. Histochemistry on vibratome sections of fish tissue: a comparison of fixation and embedding methods //Aquatic Biology. – 2015. – T. 23. – №. 3. – C. 251-263.

Stewart D. C. et al. Mechanical characterization of human brain tumors from patients and comparison to potential surgical phantoms //PloS one. – 2017. – Т. 12. – №. 6. – С. e0177561.

Tsitlakidis A. et al. Atomic Force Microscope Nanoindentation Analysis of Diffuse Astrocytic Tumor Elasticity: Relation with Tumor Histopathology //Cancers. – 2021. – Т. 13. – №. 18. – С. 4539.

Bouchonville N. et al. AFM mapping of the elastic properties of brain tissue reveals kPa μm− 1 gradients of rigidity // Soft Matter. – 2016. – Т. 12. – №. 29. – С. 6232-6239.

УДК 577.25 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-52-53

ЭВОЛЮЦИЯ ЛИПИДНОГО СОСТАВА ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Е.А. Стекольщикова, А.И. Ткачев, М.С. Осетрова, Д.Н. Смирнов, О.И. Ефимова, Е.Е. Храмеева

Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия
121205, Москва, Большой бульвар, д. 30, стр. 1
e-mail: e.khrameeva@skoltech.ru

Разработаны методики экстракции липидов и масс-спектрометрического анализа, которые обеспечивают одновременное детектирование максимального количества различных липидных классов и индивидуальных веществ в составе мозга человека, а также подходы к биоинформатическому анализу полученных данных.

Ключевые слова: эволюция, липидом, мозг, масс-спектрометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, биоинформатика.

Несмотря на то, что мозг человека обладает многоуровневой молекулярной организацией, большинство работ, проводимых в настоящее время, сосредоточено либо на исследовании базовой структурной организации мозга, например, составлении каталогов типов мозговых клеток на основании изучения их электрофизиологических свойств и профилей экспресии мРНК, либо на исследовании общей функциональной организации мозговых функциональных сетей с использованием функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ). Молекулярная организация мозга человека на уровне липидов и метаболитов, небольших молекул напрямую участвующих в реализации всех мозговых функций, остается на данный момент практически неизвестной.

В то же время, липиды составляют более 50% сухого веса мозгового вещества и выступают не только как структурные компоненты мембран, но и в качестве сигнальных молекул и активных компонентов различных белковых комплексов. Кроме того, выявлены массивные изменения в концентрациях липидов головного мозга при когнитивных заболеваниях, сопряженных с нарушением функций головного мозга у человека, таких как аутизм и шизофрения. Реализация таких когнитивных процессов, как социальное поведение, реакция на стресс, а также посттравматические поведенческие синдромы связана с изменениями в липидоме. Эти наблюдения, а также тот факт, что липиды играют ключевую роль во всех процессах, происходящих в головном мозге, говорят о том, что липидом головного мозга является многообещающим источником информации о функциональной активности мозга.

Ранее мы показали, что липидом головного мозга человека быстро эволюционировал, что указывает на существование отличий в содержании липидов характерных для человеческого мозга, которые могут быть потенциально связаны с возникновением у человека новых когнитивных функций. В настоящем исследовании, мы измерили липидный состав для 75 регионов головного мозга, охватывающих все основные структуры мозга у здоровых взрослых людей. При этом особый акцент сделан на изучении функционально различных зон неокортекса: из 75 исследуемых регионов, 60 представляют неокортекс. Для 33 из 75 регионов головного мозга, 24 из которых находятся в неокортексе, мы выявили особенности липидного состава, характерные исключительно для человека. Для этого нами проведены дополнительные измерения липидного состава у видов, эволюционно наиболее близких к человеку: шимпанзе, бонобо и макаки. Проведенный анализ позволяет выявить особенности липидомов функционально различных регионов мозга, уникальные для человека,

Проведенное нами исследование позволяет создать целостную картину молекулярной организации головного мозга человека, включая особенности, характерные исключительно для человека, а также выделить ключевые регионы мозга и функциональные совокупности этих регионов, которые могут служить

объектом дальнейших исследований, нацеленных на изучение процессов развития когнитивных способностей у человека.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-70077.

UDC 577.25 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-52-53

EVOLUTION OF THE LIPID COMPOSITION OF THE HUMAN BRAIN

E.A. Stekolshchikova, A.I. Tkachev, M.S. Osetrova, D.N. Smirnov, O.I. Efimova, E.E. Khrameeva

Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia
121205, Moscow, Bolshoy Boulevard 30, bld. 1
e-mail: e.khrameeva@skoltech.ru

We measured lipid composition for 33 regions of the brain, covering all basic brain structures in healthy humans, chimpanzees, bonobos, and macaques. This analysis allows us to identify features of lipidomes of functionally divergent brain regions that are unique to humans.

Keywords: evolution, lipidome, brain, mass-spectrometry, high-throughput liquid chromatography, bioinformatics.

Though the human brain has a multi-level molecular organization, most of the current research is focused either on the basic structural organization of the brain, for example, catalogs of brain cell types based on the study of their electrophysiological properties and mRNA expression profiles, or on the general functional organization of brain functional networks obtained using functional magnetic resonance imaging (fMRI). The molecular organization of the human brain at the level of lipids and metabolites, small molecules directly involved in the implementation of all brain functions, remains virtually unknown at the moment.

At the same time, lipids make up more than 50% of the dry weight of the brain and act not only as structural components of the membranes but also as signaling molecules and active components of various protein complexes. Moreover, massive changes in brain lipid concentrations were detected in cognitive diseases associated with impaired human brain functions, such as autism and schizophrenia. Besides, the implementation of cognitive processes such as social behavior, reaction to stress, and post-traumatic behavioral syndromes is associated with changes in lipidome. These observations, as well as the fact that lipids play a key role in all processes occurring in the brain, suggest that a brain lipidome can be a promising source of information about the functional activity of the brain.

Recently we found that human brain lipids rapidly evolved, indicating the existence of differences in the lipid content characteristic of the human brain, which may be potentially associated with the emergence of new cognitive functions in humans. Here we have measured the lipid composition for 75 regions of the brain, covering all the basic brain structures in healthy adults. In this case, particular emphasis is placed on the study of functionally different zones of the neocortex: of the 75 regions studied, 60 represent the neocortex. For 33 of the 75 regions of the brain, 24 of which are in the neocortex, we identified features of the lipid composition that are characteristic exclusively for humans. For this, we have conducted additional measurements of the lipid composition in species that are evolutionarily closest to humans: chimpanzees, bonobos, and macaques. This analysis allows us to identify features of lipidomes of functionally different brain regions that are unique to humans.

Our study creates a comprehensive picture of the molecular organization of the human brain, including features that are unique to humans, allowing us to identify key regions of the brain and functional aggregates of these regions that can serve as the object of further research aimed at studying cognitive abilities emerging in humans.

Acknowledgments: The reported study was funded by RFBR, project number 20-34-70077.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ И ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ МИКРО РНК

EXTRACELLULAR VESICLES AND CIRCULATING MICRO RNA

1. АСИММЕТРИЧНАЯ ГЛУБИННАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ – УНИВЕРСАЛЬНЫЙ И МАСШТАБИРУЕМЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ
Василий С. Чернышев, Роман Н. Чупров-Неточин, Екатерина Цыденжапова , Елена В. Свирщевская, Римма А. Полтавцева, Анастасия Мердалимова, Алексей Ященок, Амиран Кешелава, Константин Сорокин, Варлам Кешелава , Геннадий Т. Сухих , Дмитрий Гори, Сергей Леонов, Михаил Скляр 55

ASYMMETRIC DEPTH-FILTRATION – A VERSATILE AND SCALABLE APPROACH FOR ISOLATION AND PURIFICATION OF EXTRACELLULAR VESICLES
Vasiliy S. Chernyshev, Roman N. Chuprov-Netochin, Ekaterina Tsydenzhapova, Elena V. Svirshchevskaya, Rimma A. Poltavtseva, Anastasiia Merdalimova, Alexey Yashchenok, Amiran Keshelava, Konstantin Sorokin, Varlam Keshelava, Gennadiy T. Sukhikh, Dmitry Gorin, Sergey Leonov, Mikhail Skliar 56

2. НОВЫЕ P-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ КАК АНТИСМЫСЛОВЫЕ АГЕНТЫ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ
Буракова Е.А., Клабенкова К.В., Держалова А.Ш., Патрушев Д.Э., Бизяев С.Н., Фокина А.А., Стеценко Д.А. 56

NEW P-MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES AS NEXT GENERATION ANTISENSE AGENTS
E.A. Burakova, K.V. Klabenkova, A.S. Derzhalova, D.E. Patrushev, S.N. Bizyaev, A.A. Fokina, D.A. Stetsenko 58

3. ВЕЗИКУЛЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ КАК ДОСТАВЩИКИ ЭКЗОГЕННЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БИОМОЛЕКУЛ
Л.А. Гараева, Р.А. Камышинский, Е.Ю. Варфоломеева, С.Б. Ланда, Ю.В. Киль, Е.Ю. Комарова, Е.Д. Путевич, А.Л. Коневега, Т.А. Штам 59

PLANT-DERIVED VESICLES AS CARRIES OF EXOGENOUS FUNCTIONAL BIOMOLECULES
L. Garaeva, R. Kamyshnsky, E. Varfolomeeva, S. Landa, Y. Kil, E. Komarova, E. Putevich, A. Konevega, T. Shtam 60

УДК 616-71 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-55-56

АСИММЕТРИЧНАЯ ГЛУБИННАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ – УНИВЕРСАЛЬНЫЙ И МАСШТАБИРУЕМЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

Василий С. Чернышев [1,2], **Роман Н. Чупров-Неточин** [2], **Екатерина Цыденжапова** [2], **Елена В. Свирщевская** [3], **Римма А. Полтавцева** [4], **Анастасия Мердалимова** [1], **Алексей Ященок** [1], **Амиран Кешелава** [5], **Константин Сорокин** [5], **Варлам Кешелава** [6], **Геннадий Т. Сухих** [4], **Дмитрий Горин** [1], **Сергей Леонов** [2], **Михаил Скляр*** [7,8]

[1] Сколковский институт науки и технологий, Москва, Российская Федерация
[2] Факультет биологической и медицинской физики, Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская область, Российская Федерация
[3] Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Российская Федерация
[4] Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, Министерство здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация
[5] ООО "Простагност", Москва, Российская Федерация
[6] Институт биологического приборостроения РАН, Пущино, Российская Федерация
[7] Факультет химической инженерии, Университет штата Юты, Соединенные Штаты
[8] Институт нанотехнологий штата Юта, Университет штата Юта, Соединенные Штаты

Электронная почта: V.Chernyshev@skoltech.ru
Телефон: +7-916-607-40-54

Был разработан и протестирован новый метод, основанный на асимметричной глубинной фильтрации, для выделения внеклеточных везикул (ВВ) из биологических жидкостей: плазмы, мочи, желе Уортона и клеточных культур. Результаты показали, что такой метод может быть надежной альтернативой для исследований ВВ и их применения в медицине.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, выделение, глубинная фильтрация, биологические жидкости

Представлен новый подход, основанный на асимметричной глубинной фильтрации, (ГФ) для выделения внеклеточных везикул (ВВ) из биологических жидкостей, и его эффективность сравнивается со стандартными методами. Разработанный метод прост, недорог и относительно быстр. По сравнению с ультрацентрифугированием и хроматографией с исключением размера, разработанный метод позволяет выделять ВВ с более высокой чистотой и выходом. Для его реализации требуется только стандартное лабораторное оборудование, что делает его подходящим для лабораторий с ограниченными ресурсами. Описанная реализация метода подходит для выделения ВВ из биологических образцов с небольшим объёмом, для диагностики и лечения. Следуя процессам расширения для биопроизводства терапевтических средств, которые обычно полагаются на ГФ в качестве одного из этапов очистки продукта, разработанный метод может быть расширен до получения терапевтических ВВ из больших объемов среды.

Финансирование
Представленная работа была поддержана Российским Научным Фондом (грант № 20-73-00102).

UDC 616-71 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-55-56

ASYMMETRIC DEPTH-FILTRATION – A VERSATILE AND SCALABLE APPROACH FOR ISOLATION AND PURIFICATION OF EXTRACELLULAR VESICLES

Vasiliy S. Chernyshev* [1,2], **Roman N. Chuprov-Netochin** [2], **Ekaterina Tsydenzhapova** [2], **Elena V. Svirshchevskaya** [3], **Rimma A. Poltavtseva** [4], **Anastasiia Merdalimova** [1], **Alexey Yashchenok** [1], **Amiran Keshelava** [5], **Konstantin Sorokin** [5], **Varlam Keshelava** [6], **Gennadiy T. Sukhikh** [4], **Dmitry Gorin** [1], **Sergey Leonov** [2], **Mikhail Skliar*** [7,8]

[1] Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russian Federation
[2] School of Biological and Medical Physics, Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, Russian Federation
[3] Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russian Federation
[4] National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation
[5] Prostagnost LLC, Moscow, Russian Federation
[6] Institute for Biological Instrumentation RAS, Pushchino, Russian Federation
[7] Department of Chemical Engineering, University of Utah, United States
[8] The Nano Institute of Utah, University of Utah, United States
E-mail: V.Chernyshev@skoltech.ru
Phone: +7-916-607-40-54

A new method that is based on asymmetric depth-filtration was developed and tested for isolation of extracellular vesicles (EVs) from biological fluids such as human plasma, urine, Wharton's jelly and cell culture. Results showed that such method can be a reliable alternative for EV research and their application in medicine.

Keywords: extracellular vesicles, isolation, depth filtration, biological fluids

A novel asymmetric depth filtration (DF) approach for isolation of extracellular vesicles (EVs) from biological fluids is presented, and its performance is compared with established methods. The developed workflow is simple, inexpensive, and relatively fast. Compared with ultracentrifugation and size-exclusion chromatography, the developed method isolates EVs with higher purity and yield. Only standard laboratory equipment is needed for its implementation, which makes it suitable for low-resource locations. The described implementation of the method is suitable for EV isolation from small biological samples in diagnostic and treatment guidance applications. Following the scale-up routes adopted in the biomanufacturing of therapeutics, which routinely rely on DF as one of the product purification steps, the developed method may be scaled up to harvesting therapeutic EVs from large volumes of growth medium.

Funding
This work was supported by the Russian Science Foundation under Grant № 20-73-00102.

УДК 577.113.(7+4):547.327 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-56-59

НОВЫЕ Р-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ КАК АНТИСМЫСЛОВЫЕ АГЕНТЫ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ

Буракова Е.А.[1,2], **Клабенкова К.В.**[1,2], **Держалова А.Ш.**[2], **Патрушев Д.Э.**[1,2], **Бизяев С.Н.**[2,3], **Фокина А.А.**[1,2], **Стеценко Д.А.**[1,2]

[1] Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия
[3] Институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия
630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 10
stetsenkoda@bionet.nsc.ru

Замещение фосфатных связей в межнуклеотидных положениях фосфорилиминовыми или сульфонилфосфорамидными группами позволяет получить новые аналоги ДНК и РНК, обладающие перспективными свойствами для создания антисмысловых терапевтических агентов следующего поколения.

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, антисмысловые (антисенс) олигонуклеотиды, аналоги ДНК, РНКаза Н, доставка в клетки.

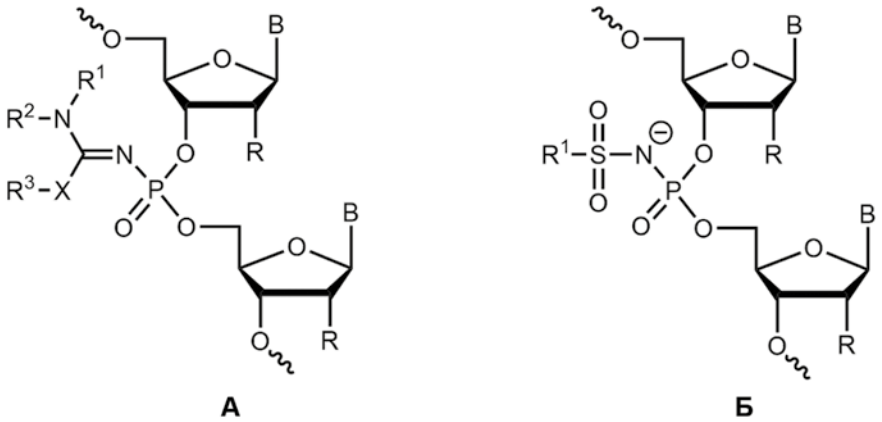


Рис. 1. *Структура Р-модифицированных олигонуклеотидов на основе фосфорилиминов (А) и сульфонилфосфорамидов (Б). R = H, O-алкил или F, R^1, R^2 = H или алкил; R^3 = алкил; X = N-алкил, O или S (А); R^1 = алкил, арил или гетероарил (Б).*

Широкое применение антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) как лекарств осложняется их часто неблагоприятной фармакокинетикой и недостаточной биодоступностью. Должны быть также решены вопросы токсичности АСО. Чтобы успешно конкурировать с малыми интерферирующими РНК, которые используются в меньших дозах и обладают пролонгированным действием, АСО должны иметь длительное время циркуляции, что приведет к усилению терапевтического эффекта. Эта задача может быть выполнена с помощью модификации фосфатных групп для увеличения метаболической устойчивости АСО по сравнению с существующими аналогами, такими как тиофосфаты.

Нами были впервые получены производные ДНК и РНК, в которых межнуклеотидные фосфатные связи заменены фосфорилиминогруппами, например, содержащими остаток гуанидина (рис. 1А), которые проявили себя перспективными антибактериальными агентами [1]. Был также впервые осуществлен синтез ряда аналогов ДНК, содержащих сульфонилфосфорамидные группы (рис. 1Б). В частности, нами показано, что мезилфосфорамидные аналоги (рис. 1Б, R = H, R^1 = Me) способны активировать РНКазу Н и имеют пониженную токсичность и значительно большую устойчивость к ферментативному расщеплению по сравнению с традиционными тиофосфатами [2,3], тогда как сульфонилфосфорамиды с длинной цепью, например, гексадецильной (рис. 1В, $R^1 = C_{16}H_{33}$), обладают улучшенной доставкой в клетки [4].

Это позволяет рассматривать новые Р-модифицированные аналоги ДНК и РНК как перспективную основу для создания антисмысловых терапевтических агентов следующего поколения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 18-515-57006, 18-29-08062, 18-29-09045 и 20-04-60433) и Министерства высшего образования и науки Российской Федерации (проект Новосибирского государственного университета FSUS-2020-0035).

Литература

1. *Skvortsova Yu.V., Salina E.G., Burakova E.A., Bychenko O.S., Stetsenko D.A., Azhikina T.A. New Antisense Phosphoryl Guanidine Oligo-2'-O-Methylribonucleotide Penetrates into Intracellular Mycobacteria and Suppresses Target Gene Expression // Front. Pharmacol. 2019. Vol. 10. 1049.*
2. *Miroshnichenko S.K., Patutina O.A., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fokina A.A., Vlassov V.V., Altman S., Zenkova M.A., Stetsenko D.A. Mesyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates: improved biochemical and biological properties // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2019. Vol. 116. № 4. P. 1229-1234.*
3. *Patutina O.A., Gaponova (Miroshnichenko) S.K., Sen'kova A.V., Savin I.A., Gladkikh D.V., Burakova E.A., Fokina A.A., Maslov M.A., Shmendel' E.V., Wood M.J.A., Vlassov V.V., Altman S., Stetsenko D.A., Zenkova M.A. Mesyl phosphoramidate backbone modified antisense oligonucleotides targeting miR-21 with enhanced in vivo therapeutic potency // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2020. Vol. 117. № 51. P. 32370-32379.*
4. *Derzhalova A., Markov O., Fokina A., Shiohama Y., Zatsepin T., Fujii M., Zenkova M., Stetsenko D. Novel lipid-oligonucleotide conjugates containing long-chain sulfonyl phosphoramidate groups: Synthesis and biological properties // Appl. Sci. 2021. Vol. 11. 1174.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-56-59

NEW P-MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES AS NEXT GENERATION ANTISENSE AGENTS

E.A. Burakova[1,2], K.V. Klabenkova[1,2], A.S. Derzhalova[2], D.E. Patrushev[1,2], S.N. Bizyaev[2,3], A.A. Fokina[1,2], D.A. Stetsenko[1,2]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
[3] N.N. Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry, Novosibirsk, Russia
630090 Novosibirsk, Lavrentiev Avenue, 10
stetsenkoda@bionet.nsc.ru

Replacement of phosphate groups in internucleotidic positions by such linkages as phosphorylimines or sulfonyl phosphoramidates results in the formation of a wide spectrum of new DNA and RNA analogues that demonstrate properties corresponding to the next generation antisense therapeutics.

Key words: antisense oligonucleotides, nucleic acids, DNA analogues, RNase H, cellular uptake

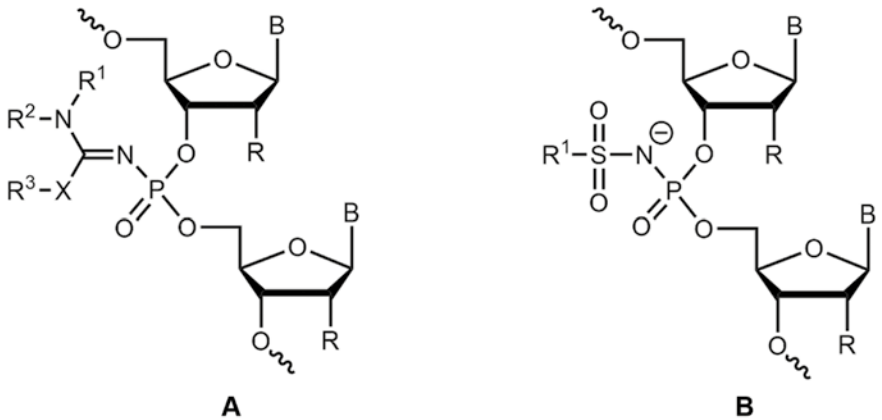


Fig. 1. *The structure of oligonucleotides incorporating P-modifications such as phosphorylimines (**A**) or sulfonyl phosphoramidates (**B**). R = H, O-alkyl or F, R^1, R^2 = H or alkyl; R^3 = alkyl; X = N-alkyl, O or S (**A**); R^1 = alkyl, aryl or heteroaryl (**B**).*

Widespread application of antisense oligonucleotide (ASO) therapeutics is complicated by their often unfavorable pharmacokinetics and insufficient bioavailability due to fast renal clearance. Additionally, sequence-dependent toxicity issues have to be solved to avoid immune complications and minimize the possibility of liver and kidney damage. To compete successfully with prospective small interfering RNA (siRNA) drugs, which would require lower doses and possess longer duration of their target-specific gene silencing effects, ASOs have to demonstrate extended half-life in circulation with concomitant beneficial impacts on therapeutic activity. This task can be accomplished by incorporation of phosphate group modifications, which further improve metabolic stability of ASOs as compared to existing backbones such as phosphorothioates.

We were the first to obtain DNA derivatives, which substitute charge-neutral phosphorylimino groups for internucleotidic phosphate linkages, in particular, those containing guanidine residues (Fig. 1A, X = N-alkyl). The latter were shown to be promising antibacterial agents capable of targeting intracellular pathogens [1]. Several DNA analogues partially or fully modified by anionic sulfonyl phosphoramidate groups were also synthesized for the first time (Fig. 1B). Among these, mesyl phosphoramidate oligodeoxynucleotides (Fig. 1B, R = H, R^1 = Me) represent a promising RNase H-recruiting type of ASOs, which possess distinct advantages over conventional phosphorothioate ASOs, in particular, lower toxicity and much higher resistance to enzymatic digestion [2,3] whereas extended aliphatic chain sulfonyl phosphoramidate groups, e.g. hexadecyl (Fig. 1B, $R^1 = C_{16}H_{33}$) conveyed increased cellular uptake [4].

This allows one to consider novel DNA and RNA analogues containing phosphorylimino or sulfonyl phosphoramidate groups as a promising platform for designing next generation antisense therapeutics.

This work was funded by RFBR (grants Nos. 18-515-57006, 18-29-08062, 18-29-09045 и 20-04-60433) and the Ministry of Higher Education and Science of the Russian Federation (project of Novosibirsk State University FSUS-2020-0035).

References

1. *Skvortsova Yu. V., Salina E. G., Burakova E. A., Bychenko O. S., Stetsenko D. A., Azhikina T. A. New Antisense Phosphoryl Guanidine Oligo-2'-O-Methylribonucleotide Penetrates into Intracellular Mycobacteria and Suppresses Target Gene Expression // Front. Pharmacol. 2019. Vol. 10. 1049.*
2. *Miroshnichenko S. K., Patutina O. A., Burakova E. A., Chelobanov B. P., Fokina A. A., Vlassov V. V., Altman S., Zenkova M. A., Stetsenko D. A. Mesyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates: improved biochemical and biological properties // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2019. Vol. 116. № 4. P. 1229-1234.*
3. *Patutina O. A., Gaponova (Miroshnichenko) S. K., Sen'kova A. V., Savin I. A., Gladkikh D. V., Burakova E. A., Fokina A. A., Maslov M. A., Shmendel' E. V., Wood M. J. A., Vlassov V. V., Altman S., Stetsenko D. A., Zenkova M. A. Mesyl phosphoramidate backbone modified antisense oligonucleotides targeting miR-21 with enhanced in vivo therapeutic potency // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2020. Vol. 117. № 51. P. 32370-32379.*
4. *Derzhalova A., Markov O., Fokina A., Shiohama Y., Zatsepin T., Fujii M., Zenkova M., Stetsenko D. Novel lipid-oligonucleotide conjugates containing long-chain sulfonyl phosphoramidate groups: Synthesis and biological properties // Appl. Sci. 2021. Vol. 11. 1174.*

УДК: 577.29, ББК: 28.05 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-59-61

ВЕЗИКУЛЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ КАК ДОСТАВЩИКИ ЭКЗОГЕННЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БИОМОЛЕКУЛ

Л.А. Гараева[1], Р.А. Камышинский[2], Е.Ю. Варфоломеева[1], С.Б. Ланда[1], Ю.В. Киль[1], Е.Ю. Комарова[3], Е.Д. Путевич[1], А.Л. Коневега[1], Т.А. Штам[1]

[1] *НИЦ «Курчатовский институт»-ПИЯФ, Россия, 188300, Гатчина, Орлова Роща, 1, garaeva.luiz@yandex.ru, +79500004312*
[2] *НИЦ «Курчатовский институт», Россия, 123182, Москва, Академика Курчатова, 1*
[3] *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, Россия, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, 4*

Продемонстрирована эффективность доставки экзогенных функциональных биомолекул к клеткам человека при помощи везикул растительного происхождения *in vitro*. Оценено распределение нагруженных растительных везикул в тканях *in vivo*.

Ключевые слова: экзосомы, везикулы растительного происхождения, система доставки терапевтических агентов

Экстраклеточные везикулы (ЭВ), в частности экзосомы, представляют собой окруженные липидным бислоем нановезикулы, секретируемые многими клетками [1]. На сегодняшний день, в силу того, что экстраклеточные везикулы являются природными частицами, способными переносить большое количество нуклеиновых кислот и белков, сохраняя их стабильность, разработка систем доставки терапевтических биомолекул на основе ЭВ вызывает широкий интерес у научного сообщества [2].

Тем не менее, на пути использования полученных из биологических жидкостей ЭВ в качестве доставщиков терапевтических агентов стоит ряд этических и производственных ограничений. Поэтому внеклеточные везикулы растительного происхождения (PEVs) являются более перспективными для решения таких задач. Считается, что PEVs биосовместимы, биоразлагаемыми и могут быть получены в значительном количестве [3].

Цель данного исследования – оценить эффективность доставки экзогенных функциональных белков растительными везикулами к клеткам человека *invitro*.

В настоящей работе PEVs из грейпфрутового сока были выделены методом ультрацентрифугирования, после чего охарактеризованы по размеру, концентрации и морфологии при помощи анализа траектории наночастиц, динамического светорассеяния, атомно-силовой микроскопии и криоэлектронной микроскопии, что позволило получить высококачественные изображения мембранных везикул грейпфрута. Большая часть везикул имела сферическую форму, образованную липидным бислоем.

Используя модели культивирования клеток *invitro*, было показано, что внеклеточные везикулы грейпфрута (GF-EVs) высокоэффективны для доставки экзогенных белков бычьего сывороточного альбумина (BSA) и белка теплового шока (HSP70), меченных Alexaflour 647, в клетки аденокарциномы толстой кишки человека HCT-116 и DLD1. Кроме того, была подтверждена функциональная активность белков, доставленных в клеточные линии человека при помощи растительных везикул *invitro*.

В ходе работы была также произведена оценка распределения в тканях GF-EVs, нагруженных BSA, меченным радиоактивным 125I (125I-BSA) *invivo*. Биораспределение оценивали количественно с помощью гамма-подсчета *ex vivo* Радиоактивность наблюдалась в легких, мочевом пузыре, матке и яичниках, в печени, селезенке, почках, сердце, а также в образцах мозга. Было продемонстрировано, что 125I-BSA, нагруженный в GF-EVs, более эффективно распределяется по кровотоку и накапливается в различных тканях организма.

Результаты данного исследования доказывают возможность использования нативных PEVs в системах доставки терапевтических агентов.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках гранта №19-74-20146.

Литература

1. *Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. Cell Mol Life Sci. 2018;75(2):193-208.*
2. *Sil S, Dagur RS, Liao K, et al. Strategies for the use of Extracellular Vesicles for the Delivery of Therapeutics [published online ahead of print, 2019 Aug 27]. J Neuroimmune Pharmacol. 2019;10.*
3. *Meng, W. et al. Prospects and challenges of extracellular vesicle-based drug delivery system: Considering cell source. Drug Deliv. 27, 585–598 (2020).*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-59-61

PLANT-DERIVED VESICLES AS CARRIES OF EXOGENOUS FUNCTIONAL BIOMOLECULES

L. Garaeva[1], R. Kamyshnsky[2], E. Varfolomeeva[3], S. Landa[1], Y. Kil[1], E. Komarova[3], E. Putevich[1], A. Konevega[1], T.Shtam[1]

[1] *Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», Russia, 188300, Gatchina, Orlova Roscha, 1*
[2] *National Research Center "Kurchatov Institute", Russia, 123182, Gatchina, Akademika Kurchatova , 1*
[3] *Laboratory of Cell Protection Mechanisms, Institute of Cytology of Russian Academy of Sciences, Russia, 194064, St.Petersburg, Tikhoretsky Aven, 4*

The efficiency of delivery of exogenous functional biomolecules to human cells using plant-derived vesicles has been demonstrated *in vitro*. Also the distribution of loaded plant vesicles in the tissues was studied *in vivo*.

Key words: exosomes, plant-derived vesicles, drug delivery system

Extracellular vesicles (EVs), including exosomes, are nanoscale membrane-enclosed particles released by many cells [1]. To date since nanovesicles are natural particles capable to carry large amounts of nucleic acids or proteins, development of drug delivery systems based on exosomes is widely seen in the scientific literature [2] However, there are some ethical and industrial srestrictions associated with the use of derived from biological fluids exosomes as drug delivery vesicles. So the plant-derived vesicles (PEVs) are considered promising in solving of these tasks. PEVs are biocompatible, biodegradable and can be obtained in significant amount [4]. It seems, that the plant vesicles appeared to be promising carriers of different exogenous bioactive molecules to the human cells.

The aim of this study is to evaluate the efficiency of delivery of exogenous functional proteins by plant vesicles to human cells *in vitro*.

In present work, PEVs from grapefruit juice were isolated by differential centrifugation and characterized in size, quantity, and morphology by nanoparticle tracking analysis, dynamic light scattering, atomic force microscopy, and cryo-electron microscopy. Cryo-EM experiments allowed us to obtain high-quality images of grapefruit membrane vesicles. Most of the vesicles have a spherical shape formed by a lipid bilayer.

Using *in vitro* cell culture models, we have shown that grapefruit-derived extracellular vesicles (GF-EVs) are highly efficient for delivering of the exogenous Alexa flour 647 labelled bovine serum albumin (BSA) and heat shock protein (HSP70) proteins into human colon cancer HCT-116 and DLD1 cells. Additionally, the functional activity of being delivered by plant vesicles into the culture cells has been confirmed.

In the work the distribution in a tissues of GF-EVs loaded with radioactive 125I BSA (125I-BSA was evaluated *in vivo*. Bio-distribution was quantified by *ex vivo* gamma counting. Radioactivity was observed in the lungs, bladder, uterus, and ovaries, liver, spleen, kidneys, heart and also in brain samples. It has been demonstrated that 125I-BSA loaded in GF-EVs is more efficiently distributed in the bloodstream and accumulates in various tissues of the body, compared to the free BSA protein.

The results of this study indicate the possibility of using native PEVs for therapeutic exogenous biomolecules delivery systems.

Grant: The study was supported by the Russian Science Foundation under Grant №19-74-20146.

References

1. *Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. Cell Mol Life Sci. 2018;75(2):193-208.*
2. *Sil S, Dagur RS, Liao K, et al. Strategies for the use of Extracellular Vesicles for the Delivery of Therapeutics [published online ahead of print, 2019 Aug 27]. J Neuroimmune Pharmacol. 2019;10.*
3. *Meng, W. et al. Prospects and challenges of extracellular vesicle-based drug delivery system: Considering cell source. Drug Deliv. 27, 585–598 (2020).*

ЛЕЧЕНИЕ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ПРИРОДНЫХ И РЕКОМБИНАНТНЫХ ВИРУСОВ

NATURAL AND RECOMBINANT VIRUS ONCOTHERAPY

1. ПЕРИЦИТ – НОВАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ И НАНОЧАСТИЦ В ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ
Науменко В.А., Липатова А.В., Степаненко А.А., Вишневский Д.А., Валихов М.П., Мельников П.А., Чехонин В.П. 62

PERICYTE – A NOVEL TARGET FOR ONCOLYTIC VIRUSES AND NANOPARTICLES IN CANCER THERAPY
V.A. Naumenko, A.V. Lipatova, A.A. Stepanenko, D.A. Vishnevskiy, M.P. Valikhov, P.A. Melnikov, V.P. Chekhonin 63

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-62-63

ПЕРИЦИТ – НОВАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ И НАНОЧАСТИЦ В ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ.

Науменко В.А., Липатова А.В., Степаненко А.А.,
Вишневский Д.А., Валихов М.П., Мельников П.А., Чехонин В.П.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119034, г. Москва, Кропоткинский пер., д. 23
e-mail: naumenko.vict@gmail.com

Впервые описана новая клеточная мишень для наночастиц и онколитических вирусов.

Ключевые слова: перицит, терапия опухолей, онколитический вирус, наночастицы, интравитальная микроскопия

Впервые описан новый феномен в биологии онколитических вирусов и фармакологии нанопрепаратов – специфическая чувствительность к ним опухолевых перицитов. Идентификация новой клетки-мишени для вирусов и наночастиц была проведена с использованием комплекса методов исследования – интравитальной микроскопии, иммуногистохимии, проточной цитометрии.

Инфицирование перицитов оказалось широко распространенным явлением. Оно наблюдалось при внутривенном введении вирусов двух различных семейств (аденовирус, вирус осповакцины) во всех исследованных животных моделях опухолей (рак молочной железы 4T1, меланома B16, рак толстого кишечника CT26), а также в модели заживления раны. Полученные результаты указывают на то, что перицит, а не опухолевая клетка является основной мишенью для онколитических вирусов при их системном введении. Следует отметить, что инфекция перицитов встречалась исключительно в участках неоангиогенеза (патологического или физиологического), но не вокруг зрелых сосудов в здоровых тканях.

В отличие от вирусов, не все типы наночастиц накапливались в перицитах. В большей степени, это явление было характерно для липосомальных препаратов (флуоресцентные липосомы, Келикс). При этом, помимо перицитов, липосомы были также обнаружены в других клетках опухолевого микроокружения. Накопление липосом в перицитах было характерно для широкого спектра опухолей и заживающей раны, тогда как в нормальных сосудах наблюдалось чрезвычайно редко.

Полученные результаты создают прочную основу для дальнейшего исследования роли перицитов в терапии опухолей.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-62-63

PERICYTE – A NOVEL TARGET FOR ONCOLYTIC VIRUSES AND NANOPARTICLES IN CANCER THERAPY

V.A. Naumenko, A.V. Lipatova, A.A. Stepanenko,
D.A. Vishnevskiy, M.P. Valikhov, P.A. Melnikov, V.P. Chekhonin

V. Serbsky National Medical Research Center for Psychiatry and Narcology,
119034 Moscow, Russia, Kropotkinskiy per., 23.
e-mail: naumenko.vict@gmail.com

A novel cellular target for nanoparticles and oncolytic viruses is identified.

Keywords: pericyte, cancer therapy, oncolytic virus, nanoparticles, intravital microscopy

A new phenomenon in the biology of oncolytic viruses and the pharmacology of nanomedicines was first described - the specific targeting of tumor pericytes. The identification of a new target cell for viruses and nanoparticles was carried out using a set of research methods - intravital microscopy, immunohistochemistry, flow cytometry.

Infection of pericytes has proven to be widespread. It was observed after intravenous administration of viruses of two different families (adenovirus, vaccinia virus) in all studied tumor models (4T1 breast cancer, B16 melanoma, CT26 colon cancer), as well as in a wound healing model. The results obtained indicate that pericyte, and not a tumor cell, is the main target for oncolytic viruses when administered systemically. It should be noted that infection of pericytes occurred exclusively in areas of neoangiogenesis (pathological or physiological), but not around mature vessels in healthy tissues.

Unlike viruses, not all types of nanoparticles accumulated in pericytes. To a greater extent, this phenomenon was typical for liposomal drugs (fluorescent liposomes, Caelyx). Moreover, in addition to pericytes, liposomes were also found in other cells of the tumor microenvironment. The accumulation of liposomes in pericytes was typical for a wide range of tumors and healing wounds, while in normal vessels it was extremely rare.

The results obtained provide a solid basis for further research on the role of pericytes in cancer therapy.

НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ

NANOBIOTECNOLOGY IN MEDICINE

1. СИСТЕМНАЯ ДОСТАВКА СЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ
ДЛЯ ПРИЖИЗНЕННОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ПРИ ПАТОЛОГИЯХ ПЕЧЕНИ
Абакумова Т.О., Ветошева П.И., Шохина А.Г., Мельник Д. М., Белоусов В.В., Зацепин Т.С. 67

DELIVERY OF STIMULI-SENSITIVE NANOPARTICLES
FOR VISUALIZATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN LIVER DISEASES
Abakumova T.O., Vetosheva P.I., Shokhina A.G., Melnik D.M., Belousov V.V., Zatsepin T.S. 68

2. НАРУШЕНИЕ ПОВЕДЕНИЯ У КРЫС В РАННЕМ ВОЗРАСТЕ
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА
Абрамова О.В., Зоркина Я.А., Зубков Е.А., Ушакова В.М., Морозова А.Ю. 69

EARLY BEHAVIORAL DISORDERS IN RATS UNDER THE INFLUENCE OF CHRONIC PRENATAL STRESS
Abramova O.V., Zorkina Ya.A., Zubkov E.A., Ushakova V.M., Morozova A.Yu. 70

3. БИОКОНЬЮГАТ ФИКОЭРИТРИНА С НАНОЧАСТИЦЕЙ СЕРЕБРА – ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ НАНОСТРУКТУРА
ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ РАКА, ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БИОСЕНСОРОВ И ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ БИОИНТЕРФЕЙСОВ
Бекасова О.Д., Курганов Б.И. 73

BIOCONJUGATE OF R-PHYCOERYTHRIN WITH Ag0 NANOPARTICLE – FUNCTIONAL NANOSTRUCTURE
FOR CANCER THERANOSTICS, FLUORESCENT BIOSENSORS AND ELECTROCHEMICAL BIOINTERFACES
Bekasova O.D., Kurganov B.I. 74

4. МАСШТАБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО
КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА И ПОЛУЧЕНИЕ КОНСТРУКЦИЙ НА ЕГО ОСНОВЕ
Волосникова Е.А., Есина Т.И., Гогина Я.С., Каплина О.Н. 71

SCALING OF THE PROCESS OF OBTAINING RECOMBINANT GRANULOCYTe-MACROPHAGe
COLONY-STIMULATING FACTOR AND OBTAINING CONSTRUCTS BASED ON IT
Volosnikova E.A., Esina T.I., Gogina Ya.S., Kaplina O.N. 72

5. ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ КРЫС И ЧЕЛОВЕКА
И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РАЗМЕРЫ МОДЕЛИРУЕМЫХ КИСТ СПИННОГО МОЗГА
Воронова А.Д., Степанова О.В., Карсунцева Е.К., Фурса Г.А.,
Чадин А.В., Валихов М.П., Семкина А.С., Решетов И.В., Чехонин В.П. 75

OBTAINING OF CELLULAR PREPARATIONS OF RAT AND HUMAN OLFACTORY MUCOSA
AND THEIR INFLUENCE ON THE SIZE OF MODELED SPINAL CORD CYSTALS
Voronova A.D., Stepanova O.V., Karsuntseva E.K., Fursa G.A.,
Chadin A.V., Valikhov M.P., Semkina A. P., Reshetov I.V., Chekhonin V.P. 76

6. РЕГУЛЯЦИЯ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ L-АСПАРАГИНАЗЫ RHODOSPIRILLUM RUBRUM
МЕТОДОМ ОБРАЗОВАНИЯ КОНЪЮГАТОВ ФЕРМЕНТА С ПОЛИКАТИОНАМИ
Добрякова Н.В., Жданов Д.Д., Соколов Н.Н., Кудряшова Е.В. 77

REGULATION OF BIOCATALYTIC PROPERTIES OF RHODOSPIRILLUM RUBRUM L-ASPARAGINASE
BY THE FORMATION OF ENZYME CONJUGATES WITH POLYCATIONS
Dobryakova N.V., Zhdanov D.D., Sokolov N.N., Kudryashova E.V. 78

7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИГАНДОВ СПЕЦИФИЧНЫХ К МАННОЗНЫМ РЕЦЕПТОРАМ МАКРОФАГОВ
С ПОМОЩЬЮ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И СПЕКТРАЛЬНЫХ МЕТОДОВ
Злотников И.Д., Кудряшова Е.В. 79

DETERMINATION OF LIGANDS SPECIFIC TO MACROPHAGE MANNOSE RECEPTORS
USING COMPUTER MODELING AND SPECTRAL METHODS
Zlotnikov I.D., Kudryashova E.V. 81

8. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ТЕРАПИИ ИНФЕКЦИЙ АССОЦИИРОВАННЫХ С ОБРАЗОВАНИЕМ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОПЛЕНКИ
Байдамшина Д.Р., Холявка М.Г., Тризна Е.Ю., Королева В.А., Ольшанникова С.М., Каюмов А.Р. 82

THE USE OF HYDROLYTIC ENZYMES TO INCREASE THE EFFICIENCY OF THERAPY
OF INFECTIONS ASSOCIATED WITH THE FORMATION OF BACTERIAL BIOFILM
Baidamshina D.R., Holyavka M.G., Trizna E.Y., Koroleva V.A., Olshannikova S.M., Kayumov A.R. 83

9. ТРИПСИНОЛИЗ ПОЛИУРЕТАНОВЫХ ЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ЦИКЛОДЕКСТРИНА
С ИНКАПСУЛИРОВАННЫМ МОКСИФЛОКСАЦИНОМ
Копнова Т.Ю., Якупова Л.Р., Скуредина А.А., Кудряшова Е.В. 84

TRYPSINOLYSIS OF POLYURETHANE PARTICLES BASED ON CYCLODEXTRIN WITH ENCAPSULATED MOXIFLOXACIN
Kopnova T.Yu., Yakupova L.R., Skuredina A.A., Kudryashova E.V. 85

10. НОВЫЙ БЕЛОК, СОДЕРЖАЩИЙ CQ ДОМЕН ИЗ МОЛЛЮСКА MODIOLUS KURILENSIS,
РАСПОЗНАЮЩИЙ ГЛИКАНЫ, ОБОГАЩЕННЫЕ КИСЛЫМИ ГАЛАКТАНАМИ И МАННАНАМИ,
КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЕЙ
Кумейко В.В., Гринченко А.В., Кригсхайм А., Швед Н.А.,
Егорова А.Е., Ильяскина Д.В., Карп Т.Д., Гончаров Н.В., Петрова И.Ю. 86

A NOVEL CQ DOMAIN-CONTAINING PROTEIN ISOLATED FROM THE MOLLUSK MODIOLUS KURILENSIS
RECOGNIZING GLYCANS ENRICHED WITH ACIDIC GALACTANS AND MANNANS
IS VERY PROSPECTIVE FOR BIOMEDICAL PURPOSES.
Kumeiko V.V., Grinchenko A.V., Kriegsheim A., Shved N.A.,
Egorova A.E., Ilyaskina D.V., Karp T.D., Goncharov N.V., Petrova I.Yu. 87

11. ПОКРЫТЫЕ ХИТОЗАНОМ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫЕ ЧАСТИЦЫ
КАК НОСИТЕЛИ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ В ТКАНИ ГЛАЗА
Е.В. Попова 88

CHITOSAN-COATED CALCIUM PHOSPHATE PARTICLES AS CARRIERS FOR DRUG DELIVERY TO OCULAR TISSUES
E. Popova 90

12. ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОГО КОНЪЮГАТА МУТАНТНОГО
ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДОМЕНА МЫШИНОГО РЕЦЕПТОРА PD-
Рябухина Е.В., Рязанцев Д.Ю., Свирщевская Е.В., Водовозова Е.Л. 91

PREPARATION OF A LIPOSOMAL CONJUGATE OF THE MUTANT
EXTRACELLULAR DOMAIN OF THE MOUSE PD- RECEPTOR
Ryabukhina E.V., Ryazantsev D.Yu., Svirshchevskaya E.V., Vodovozova E.L. 92

13. НАНОЧАСТИЦЫ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА, ПОКРЫТЫЕ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ,
КАК СРЕДСТВО ДОСТАВКИ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ИММУНО-, ХИМИО- И ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ
Семкина А.С., Скориков А.С., Иванова А.В., Островерхов П.В.,
Габашвили А.Н., Федотов К.А., Мельников П.А., Абакумов М.А., Чехонин В.П. 93

MAGNETIC NANOPARTICLES COATED BY SERUM ALBUMIN
AS A DELIVERY SYSTEM FOR IMMUNO-, CHEMO- AND PHOTODYNAMIC THERAPY DRUGS
Semkina A.S., Skorikov A.S., Ivanova A.V., Ostroverkhov P.V.,
Gabashvili A.N., Fedotov K.A., Melnikov P.A., Abakumov M.A., Chekhonin V.P. 94

14. ПРИМЕНЕНИЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ BDNF И NT- ПРИ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ КИСТ СПИННОГО МОЗГА
Степанова О.В., Воронова А.Д., Чадин А.В., Фурса Г.А., Карсунцева Е.К., Валихов М.П., Семкина А.С., Решетов И.В., Чехонин В.П. 95

APPLICATION OF NEUROTROPHIC FACTORS BDNF AND NT- IN CELL THERAPY OF EXPERIMENTAL POSTTRAUMATIC SPINAL CORD CYSTS.
Stepanova O.V., Voronova A.D., Chadin A.V., Fursa G.A., Karsuntseva E.K., Valikhov M.P., Semkina A.S., Reshetov I.V., Chekhonin V.P. 96

15. ПОЛУЧЕНИЕ ПОПЕРЕЧНО-СШИТЫХ АГРЕГАТОВ КАТАЛАЗЫ НА ОСНОВЕ ВАТЕРИТНОЙ МАТРИЦЫ
Тагирова М.А., Еремеев Н.Л. , Балабушевич Н.Г., Володькин Д., Клячко Н.Л. 106

PREPARATION OF CATALASE CROSS-LINKED ENZYME AGGREGATES ON THE BASE OF VATERITE MATRIX
Tagirova M.A., Eremeev N.L., Balabushevich N.G., Volodkin D., Klyachko N.L. 107

16. ПОИСК И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ЭЛЕКТРОНОАКЦЕПТОРОВ ДЛЯ L-ГАЛАКТОН-, -ЛАКТОН ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ARABIDOPSIS THALIANA
Чудин А.А., Кудряшова Е.В. 96

SEARCH AND CHARACTERIZATION OF ELECTRONOACEPTORS FOR L-GALACTONE-, -LACTONE DEHYDROGENASE FROM ARABIDOPSIS THALIANA
Chudin A.A., Kudryashova E.V. 98

17. НАНОМЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР ГЛИОМ С МУТАЦИЕЙ IDH RH КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ОНКОДИАГНОСТИКИ
Шмелев М. Е., Гулая В. С., Романишин А. О. Фарниев В. М., Швед Н. А., Кумейко В. В. 99

NANOMECHANICAL PROPERTIES OF GLIOMA CELLS WITH IDH RH MUTATION IN PRIMARY CULTURES AS PROSPECTIVE MARKERS FOR ONCODIAGNOSTICS
Shmelev M.E., Gulaya V.S., Romanishin A.O. Farniev V.M., Shved N.A., Kumeiko V.V. 100

18. НАНОДИСПЕРСИИ ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ: ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ
В.А. Щелконогов, А.М. Иншакова, Е.С. Дарнотук, А.В. Шипелова, Н.С. Шастина, О.А. Баранова, А.В. Чеканов, К.Д. Казаринов, Э.Ю. Соловьева, А.И. Федин 101

NANODISPERSIONS OF LIPOIC ACID: PRODUCTION AND STUDY OF INFLUENCE ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF PLATELETS
V.A. Shchelkonogov, A.M. Inshakova, E.S. Darnotuk, A.V. Shipelova, N.S. Shastina, O.A. Baranova, A.V. Chekanov, K.D. Kazarinov, E.Y. Solovieva, A.I. Fedin 103

19. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА ЧЕЛОВЕКА НАТИВНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В КАЧЕСТВЕ ВЕКТОРА ДЛЯ ОНКОТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ, И ОЦЕНКА ЕГО ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
Моллаев М.Д., Никольская Е.Д., Сокол М.Б., Моллаева М.Р., Фомичева М.В., Яббаров Н.Г. 104

OBTAINING OF RECOMBINANT NATIVE SEQUENCE HUMAN ALPHA-FETOPROTEIN RECEPTOR-BINDING DOMAIN AS A VECTOR FOR ONCOTHERAPY AND DIAGNOSTICS, AND EVALUATION ITS FUNCTIONAL ACTIVITY
Mollaev M.D., Nikolskaya E.D., Sokol M.B., Mollaeva M.R., Fomicheva M.V., Yabbarov N.G. 105

УДК 57.085.1 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-67-69

СИСТЕМНАЯ ДОСТАВКА СЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ПРИЖИЗНЕННОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ПРИ ПАТОЛОГИЯХ ПЕЧЕНИ

Абакумова Т.О., Ветошева П.И., Шохина А.Г., Мельник Д. М., Белоусов В.В., Зацепин Т.С.

Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия
121205, Территория Инновационного Центра "Сколково", Большой бульвар д. 30, стр. 1
e-mail: t.abakumova@skoltech.ru

Разработаны липидные наночастицы для визуализации активных форм кислорода в клетках печени, содержащие сенсор HyPer – плазмидную ДНК, кодирующую одноименный белок, а также частицы, содержащие краситель дигидроцианин. Была проведена физико-химическая характеристика полученных частиц, а также оценена их эффективность в экспериментах in vitro и in vivo.

Ключевые слова: липидные наночастицы, плазмидная ДНК, гидроцианин, активные формы кислорода

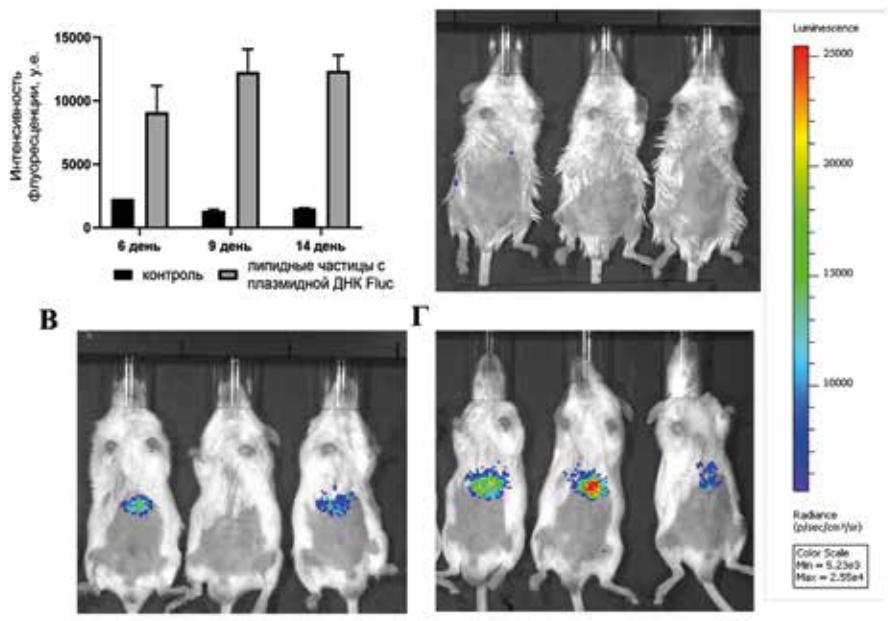


Рисунок 1. *Анализ интенсивности люминесценции (А) у мышей после внутривенного введения липидных частиц, содержащих плазмидную ДНК люциферазы светлячка (FLuc) через 3 дня (А), 6 дней (Б) и 9 дней после введения (В).*

Активные формы кислорода (АФК) вовлечены в развитие различных заболеваний печени. Внутриклеточный уровень АФК повышается при патологиях, ассоциированных как с воспалением, апоптозом, так и с интенсивным делением клеток. Прижизненная визуализация АФК возможна с помощью сенсоров – специфических красителей или белков (HyPer), взаимодействующих со свободными радикалами и изменяющих спектр флуоресценции. Специфическая доставка подобных сенсоров в органы-мишени может стать полезным инструментом в доклинических исследованиях, однако их введение в неконъюгированном виде ведет к неспецифическому повышению сигнала в других органах (например, в кишечнике) и быстрому выведению из организма. Создание систем на основе липидных наночастиц позволит селективно доставить АФК-чувствительные сенсоры в гепатоциты и визуализировать патологические процессы. В данном проекте нами была оптимизирована методика для инкапсуляции плазмидной ДНК HyPer, кодирующая одноименный белок, чувствительный к присутствию активных форм кислорода, а также были получены частицы, содержащие краситель дигидроцинанин. Формулирование наночастиц было проведено путем смешения растворов липидов и плазмидной ДНК/красителя ручным способом либо с помощью микрофлюидного картриджа. Было оценено влияние различных катионных липидов (DOPE, DOPC) для улучшения загрузки плазмидной ДНК внутрь частиц. Было показано, что введение катионного

липида DOPC и использование микрофлюидного картриджа позволяет получить частицы с эффективностью загрузки до 55-68% и снизить средний размер получаемых частиц до 92±5 нм. Эффективность доставки были показана при внутривенном введении частиц с модельной плазмидной ДНК люциферазы (Fluc) мышам в дозировке 50 мкг/кг, 200 мкг/кг и 500 мкг/кг через 14 дней после введения (Рисунок 1).

Работа выполнена при поддержке Гранта Президента РФ МК-1128.2020.4

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-67-69

DELIVERY OF STIMULI-SENSITIVE NANOPARTICLES FOR VISUALIZATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN LIVER DISEASES

Abakumova T.O., Vetosheva P.I., Shokhina A.G., Melnik D.M., Belousov V.V., Zatsepin T.S.

Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia
121205, Moscow, territory of innovation center "Skolkovo", Bolshoy Boulevard 30, bld. 1
e-mail: t.abakumova@skoltech.ru

We developed lipid nanoparticles for effective visualization of reactive oxygen species (ROS) in damaged hepatocytes. These nanoparticles contain ROS - sensor: 1) HyPer – plasmid DNA encoded the same protein that is sensitive to the hydrogen peroxide or 2) hydrocyanine (leuco-form of cyanine) 5). The physicochemical characterization of the obtained particles was carried out, as well as their efficacy in vitro and in vivo was evaluated.

Keywords: lipid nanoparticles, plasmid DNA, hydrocyanine reactive oxygen species

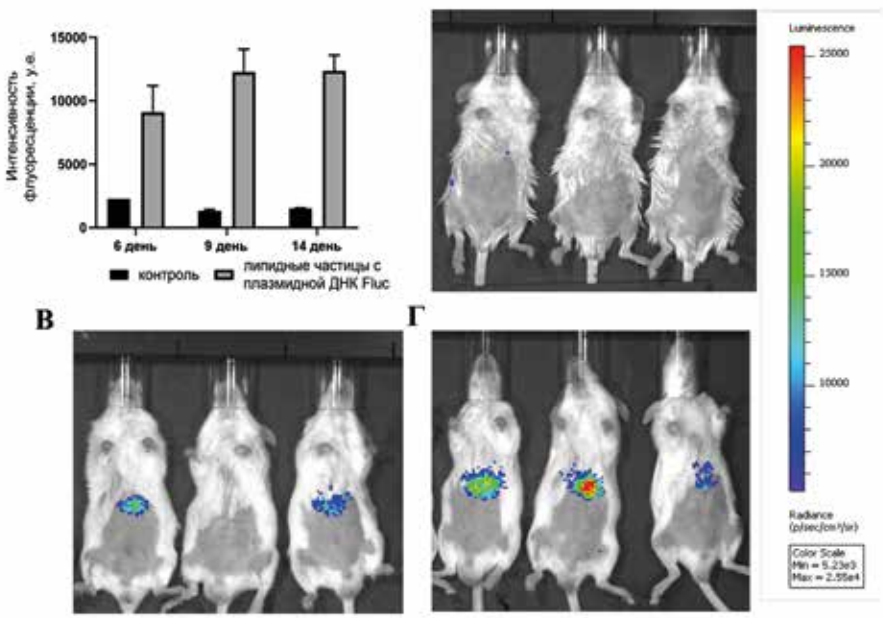


Figure 1. *Analysis of in vivo efficacy of pDNA luciferase (Fluc)- lipid nanoparticles (A) after intravenous injection in 6 days (B), 9 days (C) or 14 days (D)*

Reactive oxygen species (ROS) are involved in the development of various liver diseases. The intracellular level of ROS increases in pathologies associated with both inflammation, apoptosis, and intensive cell growth and proliferation. Intravital ROS visualization is possible by sensors -specific dyes or proteins that interact with free radicals and change the fluorescence spectrum. Targeted delivery of such sensors to pathological site can become a valuable tool in preclinical studies. However, injecting unconjugated sensors leads to a non-specific increase of the fluorescent signal in other organs (for example, intestine) and rapid excretion from the body. The drug delivery systems based on lipid nanoparticles will selectively accumulate ROS-sensitive sensors to hepatocytes and visualize them. We synthesized lipid nanoparticles with encapsulated plasmid DNA encoding a HyPer protein sensitive to reactive oxygen species. We also obtained particles containing the ROS-sensitive dye - dihydrocyanine.

The synthesis of nanoparticles was carried out by mixing lipids and plasmid DNA/dye solutions manually or using a microfluidic device. The effect of various cationic lipids (DOPE, DOPC) to improve the loading of plasmid DNA into particles was evaluated. It was shown that the introduction of the DOPC cationic lipid and microfluidics increases the loading by up to 55-68% and decrease the average diametr of the resulting nanoparticles to 92±5 nm. In vivo efficacy of the synthesized nanoparticles with model plasmid DNA luciferase (Fluc) was analyzed via intravenous injection into mice at a dosage of 50 μg/kg, 200 μg/kg and 500 μg/kg and the luminescence level was assessed 14 days after administration (Figure 1).

This work was supported by ehe grant of President MK-1128.2020.4

УДК 57.024 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-69-70

НАРУШЕНИЕ ПОВЕДЕНИЯ У КРЫС В РАННЕМ ВОЗРАСТЕ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА

Абрамова О.В., Зоркина Я.А., Зубков Е.А., Ушакова В.М., Морозова А.Ю.

Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского, Москва, Россия
119034, г. Москва, Кропоткинский пер., д. 23
Психиатрическая клиническая больница №1 им. Н.А. Алексеева Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия
117152, г. Москва, Загородное шоссе, д. 2
e-mail: abramova1128@gmail.com

Показано, что пренатальный стресс, вызванный действием переменного ультразвука, вызывает тревожное поведение и изменяет социальные предпочтения у потомства крыс в ювенильном возрасте.

Ключевые слова: пренатальный стресс; ультразвуковое воздействие; психические расстройства; нарушение поведения.

На развитие плода влияют различные факторы окружающей среды. Одним из таких факторов является стресс во время беременности. Целью нашего исследования было изучение действия хронического пренатального стресса (ПС), вызванного действием ультразвука переменных частот, на физиологическое развитие, созревание рефлексов и поведение щенков крыс в возрасте до 1 месяца.

Эксперимент был проведен на 15 материнских самках крыс линии Wistar. Самок из экспериментальной группы (n=7) после оплодотворения отсаживали в индивидуальные клетки и подвергали стрессу, вызванному хроническим воздействием ультразвука (УЗ) переменных частот 20-45 кГц на протяжении всего периода беременности (20 дней). Контрольных самок (n=8) содержали в стандартных условиях вивария в индивидуальных клетках без воздействия УЗ. Потомство от стрессированных самок, состояло из 23 самцов и 29 самок (ПС потомство). Количество щенков, родившихся от контрольных крыс состояло из 35 самцов и 33 самок. Были проведены наблюдения за физиологическим развитием щенков (определялись сроки появления волосяного покрова, прорезывания нижних резцов, открытие ушного прохода и глаз). Также, изучалось развитие сенсорно-двигательных рефлексов в течении первых 3 недель после рождения. Для этого проводили следующие тесты: переворачивание на плоскости (6 день после рождения), выползание из круга (11 день), отрицательный геотаксис (12 день), мышечная сила (16 день), ротарод (23 день). Для оценки тревожного поведения с потомством проводился тест открытое поле на 20 день после рождения. Для исследования социального поведения на 22 день после рождения проводился тест на социальную новизну в котором оценивалось предпочтение щенков в общение с матерью или чужой нелактирующей самкой.

ПС не оказал влияние на физическое развитие и на сроки созревания сенсорно-двигательных рефлексов, однако, ПС изменил поведение щенков.

В тесте открытое поле ПС потомство имело меньшую горизонтальную активность по сравнению с контролем ($F = 7{,}09$, $p = 0{,}010$). У ПС потомства было пересечено в среднем 23,5 ± 2,2 квадрата, у контрольного потомства 31,3 ± 2,4 квадрата. У ПС самцов снизилась вертикальная активность ($U = 121$, $p = 0{,}01$). ПС самцы делали в среднем 2,5 (2; 5,7) стоек; контрольные самцы 7 (4; 11) стоек. Кроме того, ПС самцы показали более высокое общее время замирания ($U = 338{,}5$, $p = 0{,}005$). Общее время замирания у ПС самцов в среднем составляло 79,9 ± 13,1 с, у контрольных самцов 29,5 (6,8; 47,4) с.

В тесте на социальную новизну, ПС потомство проводило меньше времени (в %) в отсеке с матерью (F = 8,11, p <0,001; ПС потомство 25,7 ± 3,8%, контрольное потомство 39,6 ± 4,3%). Кроме того, ПС потомство проводило больше времени (в %) в отсеке с незнакомыми самками (F = 17,95, p <0,001; ПС потомство P 56,1 ± 4,6%, контрольное потомство 40,3 ± 4,2%).

Результаты исследования показали отрицательное влияние ПС на поведение щенков крыс. Было отмечено повышение тревожности и изменение социальных предпочтений у ПС потомства по сравнению с контрольным. Полученные результаты важны для понимания этиологических факторов психоневрологических заболеваний у человека. Стресс во время беременности у людей также влияет на развитие плода и может быть причиной развития психических заболеваний у детей.

UDC 57.024 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-69-70

EARLY BEHAVIORAL DISORDERS IN RATS UNDER THE INFLUENCE OF CHRONIC PRENATAL STRESS

Abramova O.V., Zorkina Ya.A., Zubkov E.A., Ushakova V.M., Morozova A.Yu.

Serbsky Federal Medical Research Center for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia
119034, Moscow, Kropotkinskiy ln., 23
Mental-health Clinic No. 1 Named After N.A. Alexeev of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia
117152, Moscow, Zagorodnoe highway, 2
e-mail: abramova1128@gmail.com

Prenatal stress induced by exposure to variable ultrasound has been demonstrated to induce anxious behavior and change social preferences in the rat offspring at juvenile age.

Key words: prenatal stress; ultrasound exposure; mental disorders; behavioral disturbances.

Various environmental factors influence the development of the fetus. One such factor is stress during pregnancy. The aim of our study was to investigate the effect of chronic prenatal stress (PS) induced by exposure to variable frequency ultrasound on the physiological development, reflex maturation, and behavior of rat pups up to 1 month of age.

The experiment involved 15 Wistar dams. The females from the experimental group (n = 7) were kept in individual cages after fertilization and then they were stressed by chronic US impact (20-45 kHz) during the entire pregnancy (20 days). The females from the control group (n = 8) during pregnancy were kept in normal conditions in individual cages without US impact. Two offspring groups were obtained for the experiment: experimental US offspring (males (n = 23) and females (n = 29)) and control offspring (males (n = 35) and females (n = 33)). We observed the physiological development of the pups (fur appearance, lower incisor eruption, auditory canal opening, and eye opening) and the maturation of sensory-motor reflexes (surface righting reflex (postnatal day (PND) 6), negative geotaxis (PND12), muscle strength (PND16), rotarod test (PND23)). The open field test was conducted to evaluate anxiety behavior (PND20). The social novelty test was conducted to evaluate social behavior (PND22). The preference of pups in communication with the maternal females or unfamiliar females was determined.

PS does not affect the physiological development and maturation of reflexes in rat offspring. However, PS affects behavior.

PS offspring had less horizontal activity compared to control offspring in the open field test (F = 7.09, p = 0.010). PS offspring had 23.5 ± 2.2 squares crossed on average, control offspring 31.3 ± 2.4 squares crossed. We noted a decrease in vertical activity in PS males (U = 121, p = 0.01). PS males had an average of 2.5 (2; 5.7) rears; control males had 7(4; 11) rears. PS males exhibited higher total time of freezing (U = 338.5, p = 0.005). The total time of freezing in PS male averaged 79.9 ± 13.1 s, in control males 29.5 (6.8; 47.4) s.

PS offspring spent a lower percentage of time in the dam compartment (F = 8.11, p < 0.001; PS offspring 25.7 ± 3.8%, control offspring 39.6 ± 4.3%). PS offspring spent a higher percentage of time in the compartment with unfamiliar female rats (F = 17.95, p < 0.001; PS offspring 56.1 ± 4.6%, control offspring 40.3 ± 4.2%).

The results of our study showed a negative effect of PS on rat pup behavior. We identified increased anxiety and altered social preferences in PS offspring compared to controls. The results obtained are important for understanding the etiological factors of psycho-neurological diseases in humans. Stress during pregnancy in people also affects the fetus development and may be the cause of mental disorders in children.

УДК 577.112.083 : 577.112.4 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-71-73

МАСШТАБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА И ПОЛУЧЕНИЕ КОНСТРУКЦИЙ НА ЕГО ОСНОВЕ

Волосникова Е.А., Есина Т.И., Гогина Я.С., Каплина О.Н.

Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора,
633004, Новосибирская область, Бердск, ул. Химзаводская, д. 9
e-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru

Показано масштабирование процесса получения рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (ГМ-КСФ), которое позволило получить до 5 мг целевого белка с чистотой более 96% из 1 г влажных клеток. Получены молекулярные конструкции на основе ГМ-КСФ с адъювантной активностью.

Ключевые слова: гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, хроматография, молекулярная конструкция.

ГМ-КСФ используется в клинической практике для стимуляции роста гранулоцитов и макрофагов для снижения побочных эффектов радио- и химиотерапии [1].

Целью работы являлось масштабирование процесса получения субстанции ГМ-КСФ и получение молекулярных конструкций на его основе.

Культивирование рекомбинантного штамма *E. coli* SG 20050/p280_2GM проводили в лабораторном ферментере «Биотрон», Liflus SP вместимостью 15 л. Для масштабирования процесса использовали полупромышленный ферментер «Биотрон», Liflus SP вместимостью 120 л. [2, 3]. Содержание ГМ-КСФ в биомассе определяли методом электрофореза в 12 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях. Относительное содержание белка определяли с использованием программы «Gel-Pro Analyzer, Ver. 3.1».

В результате проведенной работы определены оптимальные условия культивирования штамма-продуцента *E. coli* SG 20050/p280_2GM в ферментерах. Культивирование в условиях масштабирования позволило получить биомассу штамма-продуцента *E. coli* SG 20050/p280_2GM с удельным выходом от 2,2 г/л до 3,5 г/л с содержанием белка ГМ-КСФ от 19,8 % до 26,5 %.

Полученную биомассу разрушали воздействием ультразвука при 22 кГц. Целевой белок синтезировался в клетках в виде нерастворимых телец включения (ТВ). Отмывку телец ТВ проводили трехкратно буфером, содержащим детергент. Экстракцию целевого белка из ТВ проводили буфером, содержащим 6 М мочевину. Для очистки белка ГМ-КСФ применялась комбинация двух ионообменных хроматографий на сорбентах при значении pH 8,0 [4].

В результате работы по масштабированию технологии были получены образцы субстанции ГМ-КСФ с чистотой более 96 % и выходом целевого белка более 60 % от исходного содержания, что составляет около 2-5 мг из 1 г влажных клеток.

Полученную субстанцию белка ГМ-КСФ использовали для синтеза конъюгатов с активированным декстраном в молярном соотношении 1:1. Очистку полученных конъюгатов проводили гель-фильтрацией на колонке с Сефадексом G-25. Для сборки конструкции с полученными конъюгатами использовалась субстанция дсРНК с содержанием двуспиральной РНК 14%. Сборка молекулярной конструкции осуществлялась добавлением субстанции дсРНК к препарату конъюгата ГМ-КСФ с последующей инкубацией. О полноте сборки молекулярной конструкции судили по задержке движения нуклеотидного материала в 1%-ном геле агарозы. Для оценки адъювантных свойств, проводили иммунизацию мышей овальбумином с добавлением полученных конструкций. Оценку разницы гуморального иммунного ответа экспериментальной и контрольной групп вели при помощи ИФА со специфическим антигеном.

Таким образом, проведено масштабирование процесса получения белка ГМ-КСФ на этапах культивирования и выделения целевого белка. Получены молекулярные конструкции с использованием декстрана и дсРНК, обладающие адъювантной активностью.

Литература

1. *Половинкина В.С., Косоруков В.С. Рекомбинантный чГМ-КСФ в онкологии // Росс.Биотерапевт.Журнал — 2009.— Т. 8.— №. 1.— С. 29-39.*

2. Патент РФ № 2018140842, 19.11.2018.

3. Казеев И.В. Масштабирование процесса микробиологического синтеза рекомбинантных белков: на примере получения рекомбинантного человеческого α2-интерферона: Автореф. дис. канд. техн. наук. — Москва, —2009. — 26 с.

4. Есина Т.И., Лебедев Л.Р. и др. Способ получения рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора человека // Биотехнология. — 2019. — Т. 35. — №. 3. — С. 68-73.

UDC 577.112.083 : 577.112.4 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-71-73

SCALING OF THE PROCESS OF OBTAINING RECOMBINANT GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR AND OBTAINING CONSTRUCTS BASED ON IT

Volosnikova E.A., Esina T.I., Gogina Ya.S., Kaplina O.N.

Institute of Medical Biotechnology SRC VB "Vector" Rospotrebnadzor,
Berdsk, Novosibirsk Region, Russia
e-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru

In this work, scaling of the process of obtaining recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) have been demonstrated and GM-CSF molecular constructs with adjuvant activity have been obtained. The scaling-up made it possible to obtain up to 5 mg of the target protein with a purity of more than 96% from 1 g of wet cells.

Key words: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, chromatography, molecular construct.

GM-CSF is used in clinical practice to stimulate the growth of granulocytes and macrophages to reduce the side effects of radio- and chemotherapy [1].

The aim of the work was to scale up the process of obtaining GM-CSF substance and synthesize molecular constructs based on it.

The cultivation of recombinant strain *E. coli* SG 20050 / p280_2GM was carried out in a 15 l laboratory Biotron fermenter, Liflus SP. To scale up the process a semi-industrial 120 l Biotron fermenter, Liflus SP was used. [2, 3]. The content of GM-CSF in the biomass was determined by electrophoresis in 12% polyacrylamide gel (PAGE) under denaturing conditions. The relative content of the protein was estimated by use of

"Gel-Pro Analyzer software, Ver. 3.1".

In the course of the work, we determined optimal conditions for cultivation of the producer strain *E. coli* SG 20050 / p280_2GM in both fermenters. The scaling-up cultivation made it possible to obtain biomass of the producer strain *E. coli* SG 20050 / p280_2GM with a specific yield from 2.2 g / l to 3.5 g / l, with a content of GM-CSF protein from 19.8% to 26.5%.

The obtained biomass was destroyed by exposure to ultrasound at 22 kHz. The target protein was synthesized in the cells in the form of insoluble inclusion bodies (IBs). The IBs were washed three times with the buffer containing a detergent. The extraction of the target protein from IBs was performed with the buffer containing 6 M urea. To purify the protein of GM-CSF, a combination of two ion-exchange chromatographies on sorbents at pH 8.0 was used [4].

As a result of scaling-up the technology, we obtained the substance of GM-CSF with a purity of more than 96% and a yield of the target protein of more than 60% of the initial content, which is about 2-5 mg from 1 g of wet cells.

The obtained substance of GM-CSF protein was conjugated with activated dextran in the molar ratio of 1:1. The resulting conjugates were purified by gel filtration on a Sephadex G-25 column. To assemble the construct with the conjugates, a substance of dsRNA (content of 14%) was used. The assembly of the molecular construct was carried out by adding the substance of dsRNA to the preparation of GM-CSF conjugate, followed by incubation. The completeness of the assembly of the molecular construct was determined by the delay in the movement of the nucleotide material in a 1% agarose gel. To assess the adjuvant properties, mice were immunized with ovalbumin mixed with the resulting constructs. Evaluation of the difference in the humoral immune response of the experimental and control groups was carried out by means of ELISA with a specific antigen.

Thus, scaling-up the process of obtaining GM-CSF protein at the stages of cultivation and isolation of the target protein have been performed. Molecular constructs with adjuvant activity have been obtained with the use of dextran and dsRNA.

References

1. *Polovinkina V.S., Kosorukov V.S. Recombinant hGM-CSF in antitumor therapy. Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal (In Russ), 2009, 8(1), 29-39.*
2. *RF patent No. 2018140842, 19.11.2018.*
3. *Kazeev I.V. Scaling the process of microbiological synthesis of recombinant proteins: the example of obtaining recombinant human interferon-α2: Abstr. dis. cand. tech. scien. – Moscow, 2009. – 26 p.*
4. *Esina T.I., Lebedev L.R. et al. Method for obtaining recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // Biotechnology in Russia. – 2019, 35(3), 68-73.*

УДК 577.355.2; 616.006.6 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-73-75

БИОКОНЬЮГАТ ФИКОЭРИТРИНА С НАНОЧАСТИЦЕЙ СЕРЕБРА – ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ НАНОСТРУКТУРА ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ РАКА, ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БИОСЕНСОРОВ И ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ БИОИНТЕРФЕЙСОВ

Бекасова О.Д., Курганов Б.И.

Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва,
Россия 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, корп. 2
e-mail: bekasova@inbi.ras.ru

Биоконьюгат Ag·PE получен синтезом наночастицы серебра в туннельной полости фикоэритрина (PE) без экзогенного восстановителя. Физико-химические свойства коньюгата и анализ литературных данных свидетельствуют, что Ag·PE может найти применение для диагностики и терапии (тераностики) рака, а также в качестве флуоресцентных биосенсоров и электрохимических биоинтерфейсов.

Ключевые слова: фоточувствительный биоконьюгат, наночастицы серебра, R-фикоэритрин, применения в наномедицине

Лечение рака традиционными методами часто сопровождается нежелательными побочными эффектами. Развитие новейших нанотехнологий, включая «зеленый» синтез наночастиц (НЧ) благородных металлов с использованием природных ресурсов, позволяет разрабатывать новые стратегии для тераностики рака. Биосинтезированные НЧ проявляют повышенную опухолевую специфичность, повышают эффективность противоопухолевых препаратов, менее токсичны и обладают высокой биосовместимостью по сравнению с НЧ, полученными химическим синтезом. Генерация активных форм кислорода в раковых клетках при обработке биогенными НЧ серебра приводит к запуску апоптоза и гибели клеток [1]. Нами получены НЧ Ag^0 размером 6.2 × 3.5 ± 0.5 × 0.1 нм прямоугольной формы при смешивании водных растворов R-фикоэритрина и $AgNO_3$ [2]. При этом R-фикоэритрин действует как восстановитель и стабилизатор. Фоточувствительный биоконъюгат фикоэритрина с НЧ Ag^0 хорошо растворим в воде, термостабилен, охарактеризован различными физико-химическими методами, имеет относительно большую площадь поверхности, подходящую для модификации функциональными группами с различными свойствами. R-фикоэритрин также способен восстанавливать оксид графена (GO). Композит «R-фикоэритрин-восстановленный GO-НЧ Ag» эффективно вызывает гибель раковых клеток и более цитотоксичен при низких концентрациях по сравнению с другими тестированными наноматериалами [3]. Другая чрезвычайно важная проблема - это разработка биосенсоров для диагностики и мониторинга заболеваний, доставки лекарств, протеомики. Показано, что раковые клетки после обработки биогенными НЧ Ag испускают ярко-красную флуоресценцию, в то время как необработанные клетки, используемые в качестве контроля и обработанные химически синтезированными НЧ Ag, не флуоресцируют [4]. Интенсивность флуоресценции НЧ Ag^0 в фикоэритрине на порядок выше, чем в других матрицах, поскольку R-фикоэритрин как природный фотосенсибилизатор увеличивает интенсивность флуоресценции НЧ Ag^0.

Электрические свойства Ag^0·PE сопоставимы с таковыми для проводящих композитов из полимеров с металлическими нанопроволоками. Электропроводность НЧ Ag^0 в R-фикоэритрине на постоянном

токе достигает 2.5 × 10^{-11} См/см [5]. Электрические свойства биогенных НЧ серебра и функционализация биологическими молекулами делают их полезными для создания биоинтерфейсов в электрохимических системах [6]. Эти данные показывают, что НЧ серебра, синтезированные в R-фикоэритрине, полезны для эффективной терапии рака и создания высокочувствительных оптических и электрических биосенсоров.

Литература

1. *Ovais M., Khalil A. T., Raza A. et al. Green synthesis of silver nanoparticles via plant extracts: beginning a new era in cancer theranostics // Nanomedicine (Lond.) 2016. Vol. 11. P. 3157–3177. Doi: 10.2217/nnm-2016-0279.*
2. *Бекасова О. Д., Бреховских А. А., Ревина А. А., Дубинчук В. Т. Получение и оптические свойства наночастиц серебра в белковой матрице – R-фикоэритрине // Неорган. материалы. – 2008. – Т. 44. – С. 834–840.*
3. *Choi Y-J., Gurunathan S., Kim J-H. Graphene oxide-silver nanocomposite enhances cytotoxic and apoptotic potential of salinomycin in human ovarian cancer stem cells (OvCSCs): a novel approach for cancer therapy // Int. J. Mol. Sci. 2018. Vol. 19. P. 710–733.*
4. *Mukherjee S., Chowdhury D., Kotcherlakota R. et al. Potential theranostics application of bio-synthesized silver nanoparticles (4-in-1 system) // Theranostics 2014. Vol. 4. P. 316–335.*
5. *Бекасова О. Д., Рывкина Н. Г., Чмутин И. А., Штейн-Марголина В. А., Курганов Б. И. Электрические свойства R-фикоэритрина, содержащего наночастицы Ag0, синтезированные в его туннельных полостях // Неорган. материалы. – 2017. – Т. 53. – С. 1278–1283.*
6. *Chen D., Wang G., Li J. Interfacial bioelectrochemistry: fabrication, properties and applications of functional nanostructured biointerfaces // J. Phys. Chem. C 2007. Vol. 111. P. 2351-2367.*

UDC 577.355.2; 616.006.6 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-73-75

BIOCONJUGATE OF R-PHYCOERYTHRIN WITH AG^0 NANOPARTICLE – FUNCTIONAL NANOSTRUCTURE FOR CANCER THERANOSTICS, FLUORESCENT BIOSENSORS AND ELECTROCHEMICAL BIOINTERFACES

Bekasova O.D., Kurganov B.I.

Bach Institute of Biochemistry, Fundamentals of Biotechnology Federal Research Centre,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
Leninskii pr. 33, Moscow, 119071 Russia
e-mail: bekasova@inbi.ras.ru

Bioconjugate Ag·PE was obtained by the synthesis of silver nanoparticles in the phycoerythrin tunnel cavity without an exogenous reducing agent. Physicochemical properties of the conjugate and analysis of published data indicate that Ag·PE can find application for diagnostics and therapy (theranostics) of cancer, as well as fluorescent biosensors and electrochemical biointerfaces.

Keywords: photosensitive bioconjugate, Ag^0 nanoparticles, R-phycoerythrin, applications in nanomedicine

Cancer treatment by the established methodologies is often accompanied by undesirable side effects. The development of the latest nanotechnology, including the "green" synthesis of noble metals nanoparticles (NPs) with using natural resourses, provide novel strategies for the treatment of cancer. Biosynthesized Ag NPs show increased tumor specificity, enhance the efficiency of anticancer drugs, possess low toxicity and are highly biocompatible compared to nanoparticles obtained by chemical synthesis. The generation of reactive oxygen species in cancer cells upon treatment with biogenic Ag NPs leads to the triggering of apoptosis and cell death [1]. We obtained rectangular Ag^0 NPs 6.2 × 3.5 ± 0.5 × 0.1 nm in size by mixing aqueous solutions of R-phycoerythrin and $AgNO_3$ [2]. Wherein, R-phycoerythrin acts as a reducing agent and stabilizer. Photosensitive bioconjugate of R-phycoerythrin with Ag^0 NPs is highly soluble in water, thermally stable, characterized by various physicochemical methods, has a relatively large surface area suitable for modification by functional groups with different chemical and biochemical properties. R-phycoerythrin is also capable to reduce graphene oxide (GO). "R-phycoerythrin-reduced GO-Ag NP" composite can efficiently induce death of cancer cells and more cytotoxic at lower concentrations than the other tested nanomaterials [3]. Another extremely significant problem is the development of biosensors for the diagnosis

and monitoring of diseases, drug discovery, proteomics. It was shown by fluorescence microscopy that the cancerous cells upon treatment with biogenic AgNPs emit bright red fluorescence while untreated cells used as a control and those treated with chemically synthesized AgNPs did not exhibit red fluorescence [4]. The fluorescence intensity of Ag^0 NPs in phycoerythrin is an order of magnitude higher than in other matrices, since R-phycoerythrin as a natural photosensitizer enhances the fluorescence intensity of Ag0 NPs. The electrical properties of Ag^0-PE are comparable to those of conductive polymer composites with metal nanowires. The electrical conductivity of Ag^0 NPs in R-phycoerythrin at a constant current reaches 2.5×10^{-11} S/cm [5]. The electrical properties of biogenic silver NPs and their functionalization by biological molecules make them useful for creating biointerfaces in electrochemical systems [6]. These data indicate that silver NPs synthesized in R-phycoerythrin can be useful for effective cancer therapy and the creation of highly sensitive optical and electrical biosensors.

References

1. *Ovais M., Khalil A. T., Raza A. et al. Green synthesis of silver nanoparticles via plant extracts: beginning a new era in cancer theranostics // Nanomedicine (Lond.) 2016. Vol. 11. P. 3157–3177. Doi: 10.2217/nnm-2016-0279.*
2. *Bekasova O. D., Brekhovskikh A. A., Revina A. A., Dubinchuk V. T. Preparation and optical properties of silver nanoparticles in R-phycoerythrin, a protein matrix // Inorg. Mater. 2008. Vol. 44. P. 834–840.*
3. *Choi Y-J., Gurunathan S., Kim J-H. Graphene oxide-silver nanocomposite enhances cytotoxic and apoptotic potential of salinomycin in human ovarian cancer stem cells (OvCSCs): a novel approach for cancer therapy // Int. J. Mol. Sci. 2018. Vol. 19. P. 710–733.*
4. *Mukherjee S., Chowdhury D., Kotcherlakota R. et al. Potential theranostics application of bio-synthesized silver nanoparticles (4-in-1 system) // Theranostics 2014. Vol. 4. P. 316–335.*
5. *Bekasova O. D., Ryvkina N. G., Chmutin I. A., Stein-Margolina V., Kurganov B. I. Electrical properties of R-phycoerythrin containing Ag0 nanoparticles in its channels // Inorg. Mater. 2017. Vol. 53. P. 1249–1253.*

УДК 576.536 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-75-77

ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ КРЫС И ЧЕЛОВЕКА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РАЗМЕРЫ МОДЕЛИРУЕМЫХ КИСТ СПИННОГО МОЗГА

Воронова А.Д., Степанова О.В., Карсунцева Е.К., Фурса Г.А., Чадин А.В., Валихов М.П., Семкина А.С., Решетов И.В., Чехонин В.П.

ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» МЗ РФ, Москва, Россия
119034, г. Москва, Кропоткинский пер., д. 23
e-mail: nastyanastyav@mail.ru

Обогащенные культуры обкладочных и нейральных стволовых/прогениторных клеток были получены по разработанным нами протоколам из обонятельной выстилки крыс и человека. Показано, что только трансплантация обкладочных клеток человека и крыс приводит к достоверному уменьшению размеров кист, а также полному их исчезновению у некоторых животных.

Ключевые слова: обкладочные клетки, нейральные стволовые/прогениторные клетки, обонятельная выстилка, клеточная терапия, кисты спинного мозга

Травмы спинного мозга являются причиной тяжелейших нарушений иннервации конечностей и внутренних органов. Частым исходом травм является возникновение в спинном мозге посттравматических кистозных полостей, которые со временем увеличиваются в размерах и практически не поддаются лечению. На сегодняшний день перспективным в этой области рассматривается регенеративная медицина с применением клеточных технологий. Клеточная трансплантация, в отличие от классических и хирургических методов терапии, которые приводят лишь к облегчению состоянию пациентов, способна запускать регенеративные процессы в поврежденной нервной ткани посредством секреции нейротрофических факторов (1). В экспериментальных работах и нескольких клинических испытаниях наибольшие эффекты были показаны при трансплантации в спинной мозг обкладочных и нейральных стволовых/прогениторных клеток (НСПК).

Наиболее доступным источником этих клеток является обонятельная выстилка (2). Однако обкладочные и НСПК обонятельной выстилки почти не изучены при терапии посттравматических кист спинного мозга.

Целью данного исследования было получение клеток обонятельной выстилки и изучение их влияние на размеры моделируемых посттравматических кист.

По разработанным нами протоколам были получены культуры обкладочных клеток и НСПК из обонятельной выстилки человека и крыс (3,4). Обкладочные клетки были охарактеризованы по маркерам p75NTR и GFAP, НСПК по маркерам Nestin и Sox2. Кисты спинного мозга были смоделированы по методике, разработанной в нашей лаборатории на крысах Вистар. Для визуализации кист использовали метод МРТ. Трансплантацию обкладочных клеток и НСПК как по-отдельности, так и в комбинации проводили через 4 недели после травмы в полость кисты.

Показано, что через 4 недели после трансплантации к достоверному уменьшению посттравматических кист, а также к полному их исчезновению у некоторых животных приводила только трансплантация обкладочных клеток.

Полученный результат может объясняться запуском регенеративных процессов в спинном мозге в зоне кисты в результате трансплантации обкладочных клеток. Как известно, трансплантированные в спинной мозг обкладочные клетки характеризуются высокой выживаемостью, способностью мигрировать через глиальный рубец и стимулировать регенерацию нервной ткани посредством секреции нейротрофических факторов. Для создания оптимального аутологичного и тканеспецифичного клеточного препарата для лечения травм спинного мозга необходимо дальнейшее изучение свойств обкладочных клеток обонятельной выстилки *in vitro* и их потенциала *in vivo*. Применение такого препарата в комбинации с хирургическими и медикаментозными подходами может значительно улучшить качество жизни пациентов.

Работа поддержана грантом РНФ № 17-15-01133.

Литература

1. *Yao R., Murtaza M., Velasquez J.T. et al. Olfactory Ensheathing Cells for Spinal Cord Injury: Sniffing Out the Issues // Cell Transplant. — 2018. — V. 27. — № 6. — P. 879–89.*
2. *Borgmann-Winter K., Willard S.L., Sinclair D. et al. Translational potential of olfactory mucosa for the study of neuropsychiatric ill- ness // Transl Psychiatry. —2015. — № 5. — e527.*
3. *Voronova A.D., Stepanova O.V., Valikhov M.P., et al. Preparation of Human Olfactory Ensheathing Cells for the Therapy of Spinal Cord Injuries // Bull Exp Biol Med. — 2018. — V. 164. — № 4. — P. 523-7.*
4. *Voronova A.D., Stepanova O.V., Valikhov M.P. et al. Neural Stem/Progenitor Cells of Human Olfactory Mucosa for the Treatment of Chronic Spinal Cord Injuries // Bull Exp Biol Med. — 2020. — V. 168. — № 4. — P. 538-41.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-75-77

OBTAINING OF CELLULAR PREPARATIONS OF RAT AND HUMAN OLFACTORY MUCOSA AND THEIR INFLUENCE ON THE SIZE OF MODELED SPINAL CORD CYSTALS

Voronova A.D., Stepanova O.V., Karsuntseva E.K., Fursa G.A., Chadin A.V., Valikhov M.P., Semkina A. P., Reshetov I.V., Chekhonin V.P.

The Serbsky State Scientific Center for Social and Forensic Psychiatry, Moscow, Russia
119034, Moscow, Kropotkinskiy per., 23

Enriched cultures of olfactory ensheathing cells and neural stem/progenitor cells were obtained according to our developed protocols from the olfactory mucosa of rat and human. It has been shown that only transplantation of human and rat olfactory ensheathing cells leads to a significant decrease in the size of cysts, as well as their complete disappearance in some animals.

Key words: olfactory ensheathing cells, neural stem/progenitor cells, olfactory mucosa, cell therapy, spinal cord cysts

Spinal cord injuries are the cause of the most severe disorders of the innervation of the limbs and internal organs. A common outcome of injuries is the occurrence of post-traumatic cystic cavities in the spinal cord which over time

increase in size and are not contribute to treatment. Today, regenerative medicine with the use of cellular technologies is considered promising in this area. Cell transplantation, in contrast to classical and surgical methods of therapy, which only lead to relief of the patient's condition is capable of triggering regenerative processes in the damaged nerve tissue through the secretion of neurotrophic factors (1). In experimental studies and several clinical trials the greatest effects have been shown with transplantation of olfactory ensheathing cells and neural stem progenitor cells (NSPCs) into the spinal cord. The most accessible source of these cells is the olfactory mucosa (2). However, the ensheathing cells and NSPCs of the olfactory mucosa have hardly been studied in the treatment of post-traumatic cysts of the spinal cord.

The aim of this study was to obtain cells of the olfactory mucosa and study their effect on the size of post-traumatic cysts. According to the protocols developed by us, cultures of olfactory ensheathing cells and NSPCs were obtained from the olfactory mucosa of human and rat (3,4).

The olfactory ensheathing cells were characterized by p75NTR and GFAP markers, NSPCs by Nestin and Sox2 markers. Spinal cord cysts were modeled according to the technique developed in our laboratory on Wistar rats. The cysts were visualized using MRI. Transplantation of olfactory ensheathing cells and NSPCs, both separately and in combination, was performed 4 weeks after injury into the cyst cavity.

It was shown that 4 weeks after transplantation only the transplantation of the olfactory ensheathing cells led to a significant decrease in post-traumatic cysts, as well as to their complete disappearance in some animals.

This result can be explained by the regenerative processes in the spinal cord in the cyst zone as a after transplantation of olfactory enheathing cells. As known, olfactory cells transplanted into the spinal cord are characterized by high survival, the ability to migrate through the glial scar and stimulate the regeneration of nerve tissue through the secretion of neurotrophic factors. To create an optimal autologous and tissue-specific cell preparation for the treatment of spinal cord injuries further study of the properties of olfactory ensheathing cells of olfactory mucosa *in vitro* and their potential *in vivo* is required. Cell therapy in combination with surgical and medical approaches can significantly improve the quality of life of patients.

This work is supported by Russian Science Foundation № 17-15-01133.

References

1. *Yao R., Murtaza M., Velasquez J.T. et al. Olfactory Ensheathing Cells for Spinal Cord Injury: Sniffing Out the Issues // Cell Transplant. — 2018. — V. 27. — № 6. — P. 879–89.*
2. *Borgmann-Winter K., Willard S.L., Sinclair D. et al. Translational potential of olfactory mucosa for the study of neuropsychiatric ill- ness // Transl Psychiatry. — 2015. — № 5. — e527.*
3. *Voronova A.D., Stepanova O.V., Valikhov M.P., et al. Preparation of Human Olfactory Ensheathing Cells for the Therapy of Spinal Cord Injuries // Bull Exp Biol Med. — 2018. — V. 164. — № 4. — P. 523-7.*
4. *Voronova A.D., Stepanova O.V., Valikhov M.P. et al. Neural Stem/Progenitor Cells of Human Olfactory Mucosa for the Treatment of Chronic Spinal Cord Injuries // Bull Exp Biol Med. — 2020. — V. 168. — № 4. — P. 538-41.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-77-79

РЕГУЛЯЦИЯ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ L-АСПАРАГИНАЗЫ RHODOSPIRILLUM RUBRUM МЕТОДОМ ОБРАЗОВАНИЯ КОНЪЮГАТОВ ФЕРМЕНТА С ПОЛИКАТИОНАМИ

Добрякова Н.В.[1], **Жданов Д.Д.**[2], **Соколов Н.Н.**[2], **Кудряшова Е.В.**[1]

[1] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, кафедра химической энзимологии*
[2] *Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия*
Россия, 119991, Москва, Ленинские Горы д. 1, стр. 11б
e-mail: natdobryak@gmail.com

Получены ковалентные конъюгаты аспарагиназы с сополимерами хитозан-ПЭГ, хитозан-гликоль и хитозан-ПЭИ и определена их противоопухолевая активность на клетках хронической миеломной лейкемии человека К-562.

Ключевые слова: аспарагиназа; *Rhodospirillum rubrum*; ковалентные конъюгаты; противоопухолевая активность.

Бактериальные аспарагиназы активно используются в химиотерапии рака, в первую очередь при лечении острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ). Механизм действия аспарагиназ основан на их способности гидролизовать L-аспарагин до аспарагиновой кислоты и аммиака, снижая тем самым концентрацию аспарагина в крови. Из-за недостатка аспарагина раковая клетка не может осуществлять синтез ДНК, РНК и белков, что приводит к её гибели.

На практике для лечения ОЛЛ успешно применяют аспарагиназы *Esherichia coli* (EcA) и *Erwinia carotovora* (EwA). Однако, данные аспарагиназы могут вызывать побочные эффекты, связанные с их иммуногенностью, а также способностью гидролизовать глутамин. Накопление глутаминовой кислоты в крови может приводить к гепатотоксичности, нейротоксичности, нарушению свертывания крови. В связи с этим, перспективным ферментом является L-аспарагиназа *Rhodospirillum rubrum* (RrA), обладающая меньшей глутаминазной активностью (менее 0,1 % от аспарагиназной активности) [1]. Кроме того, RrA имеет короткую аминокислотную последовательность, составляющую 172 аминокислотных остатка с низкой гомологией к EcA и EwA. Однако, у RrA pH оптимум около pH 9-9.5, что может сказываться на её каталитической активности. Также фермент может подвергаться деградации в кровотоке под действием протеолитических ферментов. Для решения этих проблем в нашей лаборатории проводится разработка метода конъюгирования фермента с полимерами [2]. Предполагается, что использование сополимера ПЭГ-хитозан, а также других ионных сополимеров, на основе гепарансульфата, полиэтиленимин (ПЭИ) и др. позволит регулировать каталитические свойства RrA, что будет способствовать увеличению её цитотоксичности и устойчивости к биодеградации.

В ходе работы методом КД-спектроскопии была определена активность аспарагиназы RrA, и ее конъюгатов с хитозан-ПЭГ. У конъюгата повышалась активность гидролиза аспарагина и стабильность к трипсинолизу. Для оптимизации состава конъюгатов по отношению к каталитическим параметрам и стабильности RrA в работе были получены полиэлектролитные комплексы с гепарином, ПЭИ, хитозаном, хитозан-ПЭГом и хитозан-гликолем. Измерение активности гидролиза аспарагина данными комплексами показало наибольший прирост активности у комплекса RrA с ПЭИ (примерно на 30 %). Для комплекса RrA-ПЭИ наблюдалось увеличение стабильности к трипсинолизу. При инкубации с трипсином при 37 °C в течение 1 ч сохранялось около 60 % от начальной активности фермента, нативный фермент сохранял менее 20 % активности в таких условиях. Для дальнейшей оптимизации каталитических свойств и цитотоксичности осуществлен синтез конъюгатов RrA с хитозан-ПЭИ, хитозан-ПЭГ, хитозан-гликоль по реакции восстановительного аминирования. Определена цитотоксическая активность ряда конъюгатов RrA в сравнении с нативным ферментом на клетках хронической миеломной лейкемии человека K-562. Противоопухолевая активность у RrA и её конъюгатов была выше, чем для коммерчески доступных препаратов аспарагиназ из EcA и EwA.

Литература

1. *Pokrovskaya M., Pokrovskiy V., Aleksandrova S., Treschalina E., Ponomarev G., Sokolov N. Recombinant intracellular Rhodospirillum rubrum L-asparaginase with low L-glutaminase activity and antiproliferative effect // Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem. 2012. Vol. 6, № 2. P. 123–131.*
2. *Sukhoverkov K. V., Sokolov N., Abakumova O., Podobed O., Kudryashova E. The formation of conjugates with PEG–chitosan improves the biocatalytic efficiency and antitumor activity of L-asparaginase from Erwinia carotovora // Moscow Univ. Chem. Bull. 2016. Vol. 71, № 2. P. 122–126.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-77-79

REGULATION OF BIOCATALYTIC PROPERTIES OF RHODOSPIRILLUM RUBRUM L-ASPARAGINASE BY THE FORMATION OF ENZYME CONJUGATES WITH POLYCATIONS

Dobryakova N.V.[1], **Zhdanov D.D.**[2], **Sokolov N.N.**[2], **Kudryashova E.V.**[1]

[1] *Chemical Faculty of Lomonosov Moscow State University, Department of Chemical Enzymology*
[2] *Orekhovich Scientific Research Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia*
1/11b, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia
e-mail: natdobryak@gmail.com

Covalent conjugates of asparaginase with copolymers of chitosan-PEG, chitosan-glycol and chitosan-PEI were obtained and their antitumor activity on human chronic myeloma leukemia K-562 cells was determined.

Key words: asparaginase; *Rhodospirillum rubrum*; covalent conjugates; antitumor activity.

Bacterial asparaginases are actively used in cancer chemotherapy, primarily in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL). The mechanism of action of asparaginases is based on their ability to hydrolyze L-asparagine to aspartic acid and ammonia thereby reducing the concentration of asparagine in the blood. Due to the lack of asparagine the cancer cell cannot synthesize DNA, RNA and proteins which leads to its death.

In practice *Esherichia coli* (EcA) and *Erwinia carotovora* (EwA) asparaginases have been successfully used to treat ALL. However, these asparaginases can cause side effects related to their immunogenicity as well as their ability to hydrolyze glutamine. The accumulation of glutamic acid in the blood can lead to hepatotoxicity, neurotoxicity and blood clotting disorders. In this regard a promising enzyme is *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase (RrA) which has a lower glutaminase activity (less than 0.1% of asparaginase activity) [1]. In addition, RrA has a short amino acid sequence of 172 amino acid residues with low homology to EcA and EwA. However, RrA has a pH optimum around pH 9-9.5 which may affect its catalytic activity. Also, the enzyme can be degraded in the bloodstream by proteolytic enzymes. To solve these problems our laboratory develops a method for conjugating an enzyme with polymers [2]. It is assumed that the use of a PEG-chitosan copolymer as well as other ionic copolymers based on heparan sulfate, polyethyleneimine (PEI) etc. will allow regulating the catalytic properties of RrA, which will increase its cytotoxicity and resistance to biodegradation.

During the work the activity of asparaginase RrA and its conjugates with chitosan-PEG was determined by CD spectroscopy. The conjugate increased the activity of asparagine hydrolysis and stability to trypsinolysis. To optimize the composition of the conjugates with respect to the catalytic parameters and stability of RrA polyelectrolyte complexes with heparin, PEI, chitosan, chitosan-PEG and chitosan-glycol were obtained in this work. Measurement of the activity of asparagine hydrolysis by these complexes showed the greatest increase in activity in the RrA complex with PEI (by about 30%). For the RrA-PEI complex an increase in stability to trypsinolysis was observed. When incubated with trypsin at 37 °C for 1 h, about 60% of the initial enzyme activity was retained, the native enzyme retained less than 20% of the activity under such conditions. To further optimize the catalytic properties and cytotoxicity the synthesis of conjugates of RrA with chitosan-PEI, chitosan-PEG, chitosan-glycol was carried out by a reductive amination reaction. The cytotoxic activity of a number of RrA conjugates was determined in comparison with the native enzyme on K-562 human chronic myeloma leukemia cells. The antitumor activity of RrA and its conjugates was higher than that of commercially available asparaginases from EcA and EwA.

References

1. *Pokrovskaya M., Pokrovskiy V., Aleksandrova S., Treschalina E., Ponomarev G., Sokolov N. Recombinant intracellular Rhodospirillum rubrum L-asparaginase with low L-glutaminase activity and antiproliferative effect // Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem. 2012. Vol. 6, № 2. P. 123–131.*
2. *Sukhoverkov K. V., Sokolov N., Abakumova O., Podobed O., Kudryashova E. The formation of conjugates with PEG–chitosan improves the biocatalytic efficiency and antitumor activity of L-asparaginase from Erwinia carotovora // Moscow Univ. Chem. Bull. 2016. Vol. 71, № 2. P. 122–126.*

УДК 615:28 615:33 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-79-82

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИГАНДОВ СПЕЦИФИЧНЫХ К МАННОЗНЫМ РЕЦЕПТОРАМ МАКРОФАГОВ С ПОМОЩЬЮ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И СПЕКТРАЛЬНЫХ МЕТОДОВ

Злотников И.Д., Кудряшова Е.В.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия
119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3, ГСП-1
E–mail: igor.zlotnikov@chemistry.msu.ru

С помощью компьютерного моделирования показано, что лектин конканавалин А является релевантной моделью маннозных рецепторов макрофагов. Определены оптимальные параметры модификации носителя лекарств β-циклодекстрина: высокая степень маннозилирования (достаточно использовать простую маннозу) – от 60%, наличие спейсеров. Такие молекулы образуют прочный комплес с рецептором конканавалином: K_d от 0,8 до 2,2 мкМ.

Ключевые слова: молекулярная динамика, нейросеть, маннозные рецепторы, CD206, конканавалин А, β-циклодекстрин.

Важной задачей для создания эффективных методик лечения различных заболеваний, в том числе туберкулёза, является не только получение самих лекарственных средств, но и их направленная доставка к пораженным тканям и клеткам [1]. В данной работе найдены наиболее специфичные к маннозным рецепторам (МР) альвеолярных макрофагов (АМ) лёгких человека лиганды и модифицированные ими носители лекарств (β-циклодекстрины, β-CD) с функцией адресной доставки. Цель работы – продемонстрировать потенциальные возможности и границы применимости и релевантности метода молекулярной динамики и использования искусственных нейросетей для определения параметров рецептор-лигандных взаимодействий. Рассмотрены маннозные рецепторы альвеолярных макрофагов, в том числе CD206 [2], - как потенциальная мишень для доставки противотуберкулёзных лекарств. Выявлены основные закономерности в связывании олигосахаридных лигандов на модели лектина Конканавалина А (ConA), демонстрирующего сходные с CD206 тенденции в распознавании углеводов. По данным моделирования наибольшей аффинностью обладают углеводы, содержащие три Man остатка, связанные 1-3 и 1-6 α-гликозидными связями (природный лиганд триманнозид, triMan), а также триманнозиды с концевыми GlcNAc остатками. Полученные с помощью компьютерного моделирования результаты полуколичественно воспроизводят экспериментальные данные, при этом все тенденции комплексообразования рассчитаны верно.

Широко используемыми носителями лекарств являются циклодекстрины (CD) [1], способные образовывать комплексы включения с биологически активными веществами и лекарственными средствами, которые требуется защитить от окисления, гидролиза, ферментативной деструкции, избыточной гигроскопичности и т.д. Для определения эффективной конфигурации β-циклодекстрина – потенциального носителя лекарств – рассмотрены различные его модификации маннозными лигандами. Оптимумом является циклодекстриновое кольцо, связанное с помощью спейсеров (например, гексаметиленамин) с маннозными остатками (7 маннозных или 3-4 диманнозных или 2-3 триманнозных). Модификация циклодекстрина D-маннозой (комплекс с ConA K_d = 2 мкМ) сравнима по эффективности с маннозилированным высокоаффинными лигандами (K_d = 0,8 мкМ), что позволяет избежать дорогих и трудоёмких синтезов и получить простой, но адресно нацеленный носитель. Результаты моделирования подтверждены методами дифференциальной спектроскопии четвёртого порядка и тушения флуоресценции (белковая триптофановая и флуоресцентная метка на циклодекстрине). Так, β-циклодекстрины, с 4 и более маннозными остатками на спейсерах связываются с рецептором с константами 10^6–10^7 M^{-1}.

Примеры высокоаффинных маннозилированных циклодекстринов приведены в таблице 1. Показано, что ConA, как и четвёртый углеводсвязывающий домен (единственный способный отдельно от других доменов взаимодействовать с углеводами) маннозного рецептора CD206 [2], специфично распознают Man- и GlcNAc-остатки, демонстрируют сходство в структурной организации сайтов связывания и мотивах Ca^{2+}-зависимого распознавания углеводов, - поэтому Конканавалин А является релевантной моделью маннозных рецепторов макрофагов.

Табл. 1. Параметры комплексообразования маннозилированных циклодекстринов с ConA в сравнении с α-D-маннозой при использовании флуоресцентных, спектральных методов, молекулярной динамики и нейросетей.

Лиганд			Константы диссоциации комплексов с ConA, мкМ		
Обозначение	Молекулярная масса (средняя), кДа	Степень маннозилирования, ±5%	По тушению флуоресценции (Trp, FITC)	Дифф. УФ-спектроскопия	Молекулярная динамика, нейросеть
Man	0,18	-	261±39	204±47	1360
β-CD-$((CH_2)_6NH_2)_7$	1828	0	94±34	102±25	152
β-CD-$((CH_2)_6NH_2)_6$-$((CH_2)_6NH\text{-}Man)_1$	1992	14	7,3±2,2	6,2±1,8	5,9
β-CD-$((CH_2)_6NH_2)_2$-$((CH_2)_6NH\text{-}Man)_5$	2648	71	0,92±0,11	0,96±0,14	2,1

Литература

1. Filatova L.Yu., Klyachko N.L., Kudryashova E.V. // Russ. Chem. Rev. 2018, V. 87. P. 374.

2. Feinberg H., Sabine A.F. Jegouzo, Lasanajak Yi, Drickamer K. et al. // J. Biol. Chem. 2021. V. 296. P. 100368.

UDC 615:28 615:33 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-79-82

DETERMINATION OF LIGANDS SPECIFIC TO MACROPHAGE MANNOSE RECEPTORS USING COMPUTER MODELING AND SPECTRAL METHODS

Zlotnikov I.D., Kudryashova E.V.

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Moscow, Russia
GSP-1, stroenie 3, Leninskie Gory, Moscow, 119991
E-mail: igor.zlotnikov@chemistry.msu.ru

Computer simulations have shown that concanavalin A lectin is a relevant model of macrophage mannose receptors. Optimal parameters of modification of the drug carrier β-cyclodextrin were determined: a high degree of mannosylation (it is enough to use simple mannose) - from 60%, the presence of spacers. Such molecules form a strong complex with the concanavalin receptor: K_d from 0.8 to 2.2 μM.

Key words: molecular dynamics, neural network, mannose receptors, concanavalin A, β-cyclodextrin, CD206.

An important task for creating effective methods for the treatment of various diseases, including tuberculosis, is not only to obtain the drugs themselves, but also their targeted delivery to the affected tissues and cells [1]. In this work, the ligands most specific to the mannose receptors (MR) of alveolar macrophages (AM) of the human lungs and their modified drug carriers (β-cyclodextrins, β-CD) with the function of targeted delivery were found. The aim of the work is to demonstrate the potential possibilities and limits of applicability and relevance of the method of molecular dynamics and the use of artificial neural networks to determine the parameters of receptor-ligand interactions. Mannose receptors of alveolar macrophages, including CD206 [2], are considered as a potential target for the delivery of anti-tuberculosis drugs. The main regularities in the binding of oligosaccharide ligands on the model of Concanavalin A lectin (ConA), which shows similar trends in carbohydrate recognition to CD206, were revealed. According to the simulation data, carbohydrates containing three Man residues bound by 1-3 and 1-6 α-glycosidic bonds (natural ligand trimanoside, triMan), as well as trimannosides with terminal GlcNAc residues, have the greatest affinity. The results obtained with the help of computer modeling semi-quantitatively reproduce the experimental data, while all the trends of complex formation are calculated correctly.

Widely used drug carriers are cyclodextrins (CD) [1], capable of forming inclusion complexes with biologically active substances and drugs that need to be protected from oxidation, hydrolysis, enzymatic destruction, excessive hygroscopicity, etc.To determine the effective configuration of β-cyclodextrin – a potential drug carrier - its various modifications with mannose ligands are considered. The optimum is a cyclodextrin ring bound by spacers (for example, hexamethylenamine) with mannose residues (7 mannose or 3-4 dimannose or 2-3 trimannose). Modification of cyclodextrin with D-mannose (complex with ConA K_d = 2 μM) is comparable in efficiency to mannosylated high-affinity ligands (K_d = 0.8 μM), which avoids expensive and time-consuming syntheses and produces a simple but targeted carrier. The simulation results were confirmed by the methods of fourth-order differential spectroscopy and fluorescence quenching (protein tryptophan and fluorescent label on cyclodextrin). Thus, β-cyclodextrins with 4 or more mannose residues on spacers bind to the receptor with constants 10^6–10^7 M^{-1}.

Table 1. Parameters of complexation of mannosylated cyclodextrins with ConA in comparison with α-D-mannose using fluorescent, spectral methods, molecular dynamics, and artificial neural networks.

Ligand			Dissociation constants of complexes with ConA, μM		
Designation	*Molecular weight (average), kDa*	*Degree of mannosylation, ±5%*	*By fluorescence quenching (Trp, FITC)*	*Diff. UV Spectroscopy*	*Molecular Dynamics, Neural network*
Man	0,18	-	261±39	204±47	1360
β-CD-$((CH_2)_6NH_2)_7$	1828	0	94±34	102±25	152
β-CD-$((CH_2)_6NH_2)_6$-$((CH_2)_6NH\text{-}Man)_1$	1992	14	7,3±2,2	6,2±1,8	5,9
β-CD-$((CH_2)_6NH_2)_2$-$((CH_2)_6NH\text{-}Man)_5$	2648	71	0,92±0,11	0,96±0,14	2,1

Examples of high-affinity mannosylated cyclodextrins are given in Table 1. It has been shown that ConA, as well as the fourth carbohydrate-binding domain (the only one capable of interacting with carbohydrates separately from other domains) of the CD206 mannose receptor [2], specifically recognize Man - and GlcNAc residues, and demonstrate similarity in the structural organization of binding sites and the motifs of Ca^{2+}-dependent carbohydrate recognition, so Concanavalin A is a relevant model of macrophage mannose receptors.

References

1. Filatova L.Yu., Klyachko N.L., Kudryashova E.V. // Russ. Chem. Rev. 2018, V. 87. P. 374.

2. Feinberg H., Sabine A.F. Jegouzo, Lasanajak Yi, Drickamer K. et al. // J. Biol. Chem. 2021. V. 296. P. 100368.

УДК 621.039.75 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-82-84

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ИНФЕКЦИЙ АССОЦИИРОВАННЫХ С ОБРАЗОВАНИЕМ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОПЛЕНКИ

Байдамшина Д.Р.[1], **Холявка М.Г.**[2], **Тризна Е.Ю.**[1], **Королева В.А.**[2], **Ольшанникова С.М.**[2], **Каюмов А.Р.**[1]

[1] ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет
420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18, Россия;
e-mail: kairatr@yandex.ru
[2] ФГАОУ ВО Воронежский государственный университет,
394018, Воронеж, Университетская пл., 1, Россия;
e-mail: holyavka@rambler.ru

Показано успешное разрушение биопленок и значительное снижение неспецифической бактериальной адгезии к поверхностям после обработки фицином или папаином. Комбинация ферментов с противомикробными препаратами увеличивала эффективность последних против бактерий в биопленке. Более того, обработка фицином приводит к более гладкой реэпителизации и образованию новой ткани, имеющей характеристики структуры коллагена, очень напоминающие характеристики, наблюдаемые в нативной ткани. Таким образом, как растворимый, так и иммобилизованный фицин и папаин оказываются полезными для лечения инфекций, связанных с биопленками, ускорения заживления ран и обеззараживания микробов.

Ключевые слова: протеолитические ферменты; иммобилизация на хитозане, разрушение микробных биопленок; повышение эффективности терапии.

Биопленки, сообщества поверхностно-прикрепленных бактерий, встроенных во внеклеточный матрикс, представляют собой вездесущие микробные консорциумы, обеспечивающие эффективную устойчивость составляющих клеток к воздействиям окружающей среды и иммунным ответам хозяина. Бактерии, внедренные в биопленку, обычно недоступны для противомикробных препаратов, поэтому разрушение матрикса биопленки является необходимым этапом при уничтожении микробных биопленок. Здесь мы сообщаем о свойствах растворимых и иммобилизованных на хитозане фицине и папаине как анти биопленочных, так и противомикробных препаратов, ускоряющих ранозаживление.

Для стабилизации ферментов разработаны процедуры иммобилизации на матрице хитозана. Предложенный подход позволил сохранить ~ 90% исходной общей активности фермента (при использовании азоказеина в качестве субстрата) с коэффициентом стабилизации около 5 и ~ 70% его удельной ферментативной активности.

Обнаружено успешное разрушение структур биопленок и значительное снижение неспецифической бактериальной адгезии к поверхностям после обработки фицином или папаином. *In vitro* протеазы, иммобилизованные на хитозане, разрушают стафилококковые биопленки: толщина биопленок уменьшилась вдвое после 24-часовой обработки фицином или папаином в концентрации 1000 мг / мл. Комбинация ферментов с противомикробными препаратами увеличивала эффективность последних против бактерий, встроенных в биопленку. Таким образом, лечение фицином усиливало действие антибиотиков на клетки, внедренные в биопленки, за счет разрушения матриц биопленок. Предварительная обработка фицином (1000 мг / мл) значительно снизила концентрации ципрофлоксацина и безалкония хлорида, необходимые для подавления жизнеспособных стафилококков, на 3 порядка.

In vivo в присутствии фицина (растворимого или иммобилизованного) площадь кожных ран, инфицированных *S. aureus*, у крыс уменьшалась вдвое после 4 дней лечения вместо 6. Примечательно, что свойства восстановленной ткани кажутся более близкими к образцам неповрежденной ткани по сравнению с альтернативными вариантами лечения. Более того, местное нанесение иммобилизованного фермента привело к снижению количества клеток *S. aureus* на поверхности раны в 1000 раз за 6 дней по сравнению с более чем 10 днями, необходимыми для достижения такого же эффекта в контроле. Дополнительные преимущества включают более плавную реэпителизацию и образование новой ткани, имеющей характеристики структуры коллагена, очень напоминающие характеристики, наблюдаемые в нативной ткани. По-видимому, в то время как иммобилизация папаина на основе адсорбции на хитозане приводит к быстрой десорбции фермента в растворах, это свойство может быть полезным для создания перевязочных материалов с дозированным высвобождением фермента для преодоления относительно высокой цитотоксичности растворимого папаина. также продемонстрировали, что фицин не цитотоксичен по отношению к клеткам аденокарциномы молочной железы человека (MCF7) и стволовым клеткам собаки.

Наблюдаемые эффекты и стабильность фицина с иммобилизованным хитозаном приводят к предположению о его добавлении в перевязочные материалы для ускорения заживления ран за счет предотвращения их биообрастания и повышения эффективности противомикробной обработки инфицированных ран.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №21-74-20053)

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-82-84

THE USE OF HYDROLYTIC ENZYMES TO INCREASE THE EFFICIENCY OF THERAPY OF INFECTIONS ASSOCIATED WITH THE FORMATION OF BACTERIAL BIOFILM

Baidamshina D.R.[1], **Holyavka M.G.**[2], **Trizna E.Y.**[1], **Koroleva V.A.**[2], **Olshannikova S.M.**[2], **Kayumov A.R.**[1]

[1] *Kazan (Volga Region) Federal University*
420008, Kazan, st. Kremlin, 18, Russia, e-mail: kairatr@yandex.ru
[2] *Воронежский государственный университет,*
394018, Воронеж, Университетская пл., 1, Россия; e-mail: holyavka@rambler.ru

The successful destruction of biofilm structures and the significant decrease of non-specific bacterial adhesion to the surfaces after either Ficin or Papain treatment have been detected. The combination of enzymes with antimicrobials increased the efficacy of the latter against biofilm-embedded bacteria. Moreover, Ficin treatment lead to smoother reepithelisation, and new tissue formation exhibiting collagen structure characteristics closely reminiscent of those observed in the native tissue. Thus, both soluble and immobilized Ficin and Papain appear beneficial for the treatment of biofilm-associated infections, speeding up wound healing and microbial decontamination.

Key words: Proteolytic enzymes; immobilization on chitosan, destruction of microbial biofilms; increasing the effectiveness of therapy.

Biofilms, the communities of surface-attached bacteria embedded into extracellular matrix, are ubiquitous microbial consortia securing the effective resistance of constituent cells to environmental impacts and host immune responses. Biofilm-embedded bacteria are generally inaccessible for antimicrobials, therefore the disruption of biofilm matrix is the potent approach to eradicate microbial biofilms. Here we report both anti-biofilm, antimicrobials enhancing and wound-healing properties of soluble and chitosan-immobilized Ficin and Papain.

To stabilize the enzymes, the immobilization procedures on chitosan matrixes were developed. The proposed chitosan-adsorption allowed preserving ~90% of the initial total activity of the enzyme (when using azocasein as a substrate) with stabilization factor of about 5, and ~70% of its specific enzymatic activity.

The successful destruction of biofilm structures and the significant decrease of non-specific bacterial adhesion to the surfaces after either Ficin or Papain treatment have been detected. *In vitro*, the chitosan-immobilized proteases degrade staphylococcal biofilms: the biofilm thickness decreased twofold after the 24-hours treatment with Ficin or Papain at 1000 mg/ml concentration. The combination of enzymes with antimicrobials increased the efficacy of the latter against biofilm-embedded bacteria. Thus, Ficin treatment enhanced the effects of antibiotics on biofilms-embedded cells via disruption of biofilm matrices. Pre-treatment with Ficin (1000 mg/ml) considerably reduced the concentrations of ciprofloxacin and bezalkonium chloride required to suppress the viable *Staphylococci* by 3 orders of magnitude.

In vivo, in the presence of Ficin (either soluble or immobilized), the *S. aureus*-infected skin wound areas in rats reduced twofold after 4 instead of 6 days of treatment. Remarkably, the recovered tissue properties appear closer to the intact tissue samples, compared to the alternative treatment options. Moreover, topical application of the immobilized enzyme resulted in a 3-log reduction of *S. aureus* cell count on the wound surfaces in 6 days, compared to more than 10 days required to achieve the same effect in control. Additional advantages include smoother reepithelisation, and new tissue formation exhibiting collagen structure characteristics closely reminiscent of those observed in the native tissue. Apparently, while the adsorption-based immobilization of papain on chitosan leads to fast desorption of the enzyme in solutions, this property could be beneficial for wound-dressing materials design with dosed release of the enzyme to overcome relatively high cytotoxicity of the soluble papain.We also demonstrated that Ficin is not cytotoxic towards human breast adenocarcinoma cells (MCF7) and dog adipose derived stem cells.

The observed effects and stability of the chitosan-immobilized Ficin lead to the suggestion of its addition to the wound-dressing materials in order to speed up wound healing by preventing their biofouling and enhancing the efficiency of the antimicrobial treatment of infected wounds.

This research was funded by Russian Science Foundation (grant №21-74-20053).

УДК 57.013 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-84-86

ТРИПСИНОЛИЗ ПОЛИУРЕТАНОВЫХ ЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ЦИКЛОДЕКСТРИНА С ИНКАПСУЛИРОВАННЫМ МОКСИФЛОКСАЦИНОМ

Копнова Т.Ю., Якупова Л.Р., Скуредина А.А., Кудряшова Е.В.

Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3
e-mail: kopnovataty@gmail.ru

В данной работе предложен концептуально новый подход к разработке лекарственных формуляций с пролонгированным действием – полиуретановых частиц на основе циклодекстрина с инкапсулированным моксифлоксацином, а также изучению кинетики высвобождения лекарственной молекулы в присутствии трипсина.

Ключевые слова: моксифлоксацин, циклодекстрины, трипсинолиз

Моксифлоксацин (МФ) – антибактериальный препарат широкого спектра действия. МФ хорошо проникает в респираторные жидкости и ткани, что делает его перспективным для лечения легочных инфекций, в том числе пневмонии, являющейся побочным эффектом при заражении вирусом SARSCoV-2 [1]. Терапия тяжелых респираторных заболеваний требует сложной и длительной схемы приема антибактериальных препаратов. Создание систем доставок поможет упростить схему лечения и снизить вероятность проявления побочных эффектов. Перспективным носителями для частиц с улучшенными фармакокинетическими свойствами являются циклодекстрины (ЦД). ЦД способны увеличивать растворимость и биодоступность лекарственных препаратов, обеспечивать пролонгацию их действия [2,3]. Образование полимерных частиц на основе ЦД способствует более выраженному изменению данных свойств лекарств. В настоящей работе предложен подход к получению полимерных частиц путем «сшивания» комплексов ЦД-МФ с помощью 1,6-гексаметилендиизоцианата (ГМД), что позволяет получить частицы с равномерно распределенным МФ в матрице полимера. Было получено два типа таких частиц – ПЦД-1 и ПЦД-2, которые были охарактеризованы различными методами (Таблица 1).

Таблица 1. Физико-химические свойства полимерных структур, полученных на основе комплексов МФ с СБЕ-ЦД.

Образец	Мольный избыток ГМД	Гидродинамический диаметр (pH 4,0), нм	ζ-потенциал (pH 4,0), мВ	Степень включения МФ в ПЦД, %	Mr, кДа
ПЦД-1	0,5	145 ± 13	1,1 ±0,7	83 ± 5	1466 ± 81
ПЦД-2	5	198 ± 14	0,8 ±0,3	87 ± 5	1324 ± 80

При пероральном способе введения лекарственная формуляция будет неизбежно взаимодействовать со множеством ферментов желудочно-кишечного тракта, способных разрушать полимерные молекулы. Так как в матриксных структурах присутствуют уретановые связи, важно изучить взаимодействие данных систем с трипсином, который представляет собой протеолитический фермент класса гидролаз. Основной функцией трипсина является расщепление амидных (пептидных), сложноэфирных и уретановых связей в молекулах, что обуславливает необходимость изучения его влияния на исследуемые полимерные структуры [4]. Методом равновесного диализа было установлено, что свободный МФ полностью высвобождается за 40 минут, комплексообразование с ЦД приводит к уменьшению скорости диализа на 20%. Использование матриксных структур существенно изменяет профиль высвобождения МФ: за сутки менее 25 % лекарства покидает диализный мешок. При изучении трипсинолиза частиц ПЦД методом равновесного диализа обнаружено, что трипсин ускоряет высвобождение МФ на 10-20%. При этом разрушение уретановых связей происходит на поверхности частиц за счет гидролиза, что было подтверждено измерением мутности раствора на 600 нм: постоянные значения светорассеяния свидетельствуют об отсутствии крупных продуктов гидролиза. Аналогичные результаты были получены при анализе ИК-спектров данных систем: о гидролизе уретановых связей свидетельствует увеличение интенсивности полосы 1742 см$^{-1}$, соответствующей колебаниям карбоксильной группы. Таким образом, трипсин не способен разрушать ПЦД до мономерных ЦД, что позволяет сохранить пролонгированность действия препарата в биологических средах.

Литература

1. *Barman Balfour J.A., Wiseman L.R. Moxifloxacin // Drugs. 1999. Vol. 57, № 3. P. 363–373.*
2. *Davis M.E., Brewster M.E. Cyclodextrin-based pharmaceutics: past, present and future // Nat. Rev. Drug Discov. 2004. Vol. 3, № 12. P. 1023–1035.*
3. *Skuredina A.A., Le-Deygen I.M., Kudryashova E. V. The Effect of Molecular Architecture of Sulfobutyl Ether β-Cyclodextrin Nanoparticles on Physicochemical Properties of Complexes with Moxifloxacin // Colloid J. 2018. Vol. 80, № 3. P. 312–319.*
4. *Bouvier M., Chawla A.S., Hinberg I. In vitro degradation of a poly(ether urethane) by trypsin // J. Biomed. Mater. Res. 1991. Vol. 25, № 6. P. 773–789.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-84-86

TRYPSINOLYSIS OF POLYURETHANE PARTICLES BASED ON CYCLODEXTRIN WITH ENCAPSULATED MOXIFLOXACIN

Kopnova T.Yu., Yakupova L.R., Skuredina A.A., Kudryashova E.V.

Department of Chemistry, Moscow State University M.V. Lomonosov
119991, Moscow, Leninskie gory, 1, building 3
e-mail: kopnovataty@gmail.ru

This work proposes a conceptually new approach to the development of drug formulations with prolonged action – polyurethane particles based on cyclodextrin with encapsulated moxifloxacin, as well as the study of the kinetics of drug molecule release in the presence of trypsin.

Keywords: moxifloxacin, cyclodextrins, trypsinolysis

Moxifloxacin (MF) is a broad-spectrum antibacterial drug. MF penetrates well into respiratory fluids and tissues, which makes it promising for the treatment of pulmonary infections, including pneumonia, which is a side effect of infection with the SARS-CoV-2 virus [1]. Therapy for severe respiratory diseases requires a complex and long-term regimen of antibacterial drugs. The development of delivery systems will guide simplify the treatment regimen and reduce the likelihood of side effects. Cyclodextrins (CD) are promising carriers for particles with improved pharmacokinetic properties. CDs can increase the solubility and bioavailability of drugs and ensure the prolongation of their action [2,3]. The formation of polymer particles based on CD contributes to a more pronounced change in the properties of drugs. In this work, we propose an approach to the preparation of polymer particles by “crosslinking” CD-MF complexes using 1,6-hexamethylene diisocyanate (HMD), which makes it possible to obtain particles with a uniformly distributed MF in the polymer matrix. Two types of such particles were obtained - PCD-1 and PCD-2, which were characterized by different methods (Table 1).

Table 1. Physicochemical properties of polymer structures obtained based on complexes of MF with SBE-CD.

Sample	A molar excess of HMD	Hydrodynamic diameter (pH 4.0), nm	ζ-potential (pH 4.0), mV	Degree of MF inclusion in PCD,%	Mr, kDa
PCD-1	0,5	145 ± 13	1,1 ±0,7	83 ± 5	1466 ± 81
PCD-2	5	198 ± 14	0,8 ±0,3	87 ± 5	1324 ± 80

When administered orally, the dosage formulation will inevitably interact with many gastrointestinal enzymes capable of degrading polymer molecules. Since urethane bonds are present in matrix structures, it is important to study the interaction of these systems with trypsin, which is a proteolytic enzyme of the hydrolase class. The major function of trypsin is the cleavage of amide (peptide), ester and urethane bonds in molecules, which necessitates the study of its effect on the studied polymer structures [4]. It was showed by the method of equilibrium dialysis that free MF is completely released in 40 minutes, complexation with CD leads to a decrease in the dialysis rate by 20%. The use of matrix structures significantly changes the MF release profile: less than 25% of the drug leaves the dialysis bag per day. When studying the trypsinolysis of PCD particles by the equilibrium dialysis method, it was found that trypsin accelerates the release of MF by 10-20%. In this case, the destruction of urethane bonds occurs on the surface of the particles due to hydrolysis, which was confirmed by measuring the turbidity of the solution at 600 nm: constant light scattering values indicate the absence of large hydrolysis products. Similar results were obtained when analyzing the IR spectra of these systems: the hydrolysis of urethane bonds as evidenced by an increase in the intensity of the 1742 cm^{-1} band corresponding to the vibrations of the carboxyl group. Thus, trypsin is not capable of destroying PCDs to monomeric CDs, which makes it possible to preserve the prolonged action of the drug in biological media.

References

1. *Barman Balfour J.A., Wiseman L.R. Moxifloxacin // Drugs. 1999. Vol. 57, № 3. P. 363–373.*
2. *Davis M.E., Brewster M.E. Cyclodextrin-based pharmaceutics: past, present and future // Nat. Rev. Drug Discov. 2004. Vol. 3, № 12. P. 1023–1035.*
3. *Skuredina A.A., Le-Deygen I.M., Kudryashova E. V. The Effect of Molecular Architecture of Sulfobutyl Ether β-Cyclodextrin Nanoparticles on Physicochemical Properties of Complexes with Moxifloxacin // Colloid J. 2018. Vol. 80, № 3. P. 312–319.*
4. *Bouvier M., Chawla A.S., Hinberg I. In vitro degradation of a poly(ether urethane) by trypsin // J. Biomed. Mater. Res. 1991. Vol. 25, № 6. P. 773–789.*

УДК 577.112 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-86-88

НОВЫЙ БЕЛОК, СОДЕРЖАЩИЙ C1Q ДОМЕН ИЗ МОЛЛЮСКА MODIOLUS KURILENSIS, РАСПОЗНАЮЩИЙ ГЛИКАНЫ, ОБОГАЩЕННЫЕ КИСЛЫМИ ГАЛАКТАНАМИ И МАННАНАМИ, КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЕЙ

Кумейко В.В.[1,2], **Гринченко А.В.**[1,2], **Кригсхайм А.**[3], **Швед Н.А.**[1,2], **Егорова А.Е.**[1], **Ильяскина Д.В.**[1], **Карп Т.Д.**[1], **Гончаров Н.В.**[1], **Петрова И.Ю.**[2]

[1] *Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет (ДВФУ).*
690922, Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10, кампус ДВФУ, корпус М

[2] *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского" Дальневосточного отделения Российской академии наук (ННЦМБ ДВО РАН)*
690041, Владивосток, ул. Пальчевского 17, Россия.

[3] *Университет Эдинбурга*
EH4 2XU Эдинбург, Великобритания.
e-mail: vkumeiko@yandex.ru

Впервые обнаружен, выделен и охарактеризован новый белок, содержащий C1q домен (MkC1qDC-1), из двустворчатого моллюска Modiolus kurilensis. Белок MkC1qDC-1 продемонстрировал эффективное ингибирование пролиферации клеток карциномы HeLa и распознавание некоторых фенотипов опухолевых клеток, что свидетельствует о биомедицинском потенциале его применения.

Ключевые слова: двустворчатые моллюски, C1q домен, лектины, паттерн-распознающие рецепторы, профиль гликозилирования, клетки злокачественных опухолей.

Белки, содержащие домен C1q (C1qDC), представляют собой группу биополимеров, участвующих в иммунном ответе в качестве рецепторов распознавания образов (PRR), функционирующих подобно лектинам. Впервые обнаружен и выделен новый белок MkC1qDC-1 из плазмы гемолимфы двустворчатого моллюска Modiolus kurilensis, широко распространенного в северо-западной части Тихого океана. Процедура выделения включала фракционное осаждение сульфатом аммония с последующей аффинной хроматографией на пектин-сефарозе. Изучение углеводной специфичности плазмы M. kurilensis и очищенного белка показало сильное ингибирующее действие уроновых кислот и полисахаридов на их основе. Ранее у близкородственного вида Modiolus modiolus из Северной Атлантики новые лектины были выделены с использованием муцин-сефарозы и названы модиолинами H и E [1,2]. Мы показали, что белок MkC1qDC-1, выделенный из Modiolus kurilensis, отличается от модиолинов. Полноразмерная последовательность MkC1qDC-1 была собрана на основании данных масс-спектрометрии, дополненных N-концевым секвенированием по Эдману, и включала 176 аминокислотных остатков с молекулярной массой 19 кДа, демонстрируя высокую гомологию с белками C1qDC двустворчатых моллюсков. MkC1qDC-1 продемонстрировал антибактериальные свойства в отношении грамотрицательных и грамположительных штаммов. MkC1qDC-1 связывается Ca^{2+}-зависимым образом с рядом углеводов, характеризующихся большим содержанием кислых производных галактозы и маннозы, включенных в разнообразные молекулярные разновидности гликанов. Было обнаружено, что альгинат, к-каррагинан, фукоидан и пектин являются высокоэффективными ингибиторами активности MkC1qDC-1. Дрожжевой маннан, липополисахарид (LPS), пептидогликан (PGN) и муцин показали ингибирующее действие при концентрациях на три порядка выше, чем для указанных выше полисахаридов. MkC1qDC-1 локализован в гемальной системе и интерстициальном компартменте моллюска. Установлен выраженный антипролиферативный эффект MkC1qDC-1 на линии клеток HeLa с использованием автоматизированной количественной микроскопии. Используя флуоресцентно меченый MkC1qDC-1, мы обнаружили его способность специфически распознавать некоторые фенотипы клеток злокачественных опухолей, что потенциально может представлять интерес для клинической лабораторной диагностики и создания наносистем для таргетной доставки лекарств. Полученные результаты указывают на высокий биомедицинский потенциал дальнейшего применения белка MkC1qDC-1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (выделение белка и исследование его свойств - проект №0657-2020-0004, отлов экспериментальных животных, получение и первичное фракционирование бесклеточной гемолимфы - проект №121082600034-5).

Литература

1. *Tunkijjanukij S. et al. A heterogeneous sialic acid-binding lectin with affinity for bacterial LPS from horse mussel (Modiolus modiolus) hemolymph // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. – 1997. – V. 117. – P. 273–286.*
2. *Tunkijjanukij S., Olafsen J.A. Sialic acid-binding lectin with antibacterial activity from the horse mussel: further characterization and immunolocalization // Dev. Comp. Immunol. – 1998. – V. 22. – P. 139–150.*

UDC 577.112 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-86-88

A NOVEL C1Q DOMAIN-CONTAINING PROTEIN ISOLATED FROM THE MOLLUSK MODIOLUS KURILENSIS RECOGNIZING GLYCANS ENRICHED WITH ACIDIC GALACTANS AND MANNANS IS VERY PROSPECTIVE FOR BIOMEDICAL PURPOSES.

Kumeiko V.V.[1,2], **Grinchenko A.V.**[1,2], **Kriegsheim A.**[3], **Shved N.A.**[1,2], **Egorova A.E.**[1], **Ilyaskina D.V.**[1], **Karp T.D.**[1], **Goncharov N.V.**[1], **Petrova I.Yu.**[2]

[1] *Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Far Eastern Federal University". 690922, Russian island, Ajax village, 10, building M, Vladivostok, Russia.*

[2] Federal State Budgetary Institution of Science "A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences", 690041, Palchevskogo st., 17, Vladivostok, Russia.
[3] The University of Edinburgh, Edinburgh, EH4 2XU, United Kingdom
e-mail: vkumeiko@yandex.ru

A novel C1qDC bivalve protein from the bivalve Modiolus kurilensis (MkC1qDC-1) was identified, isolated and characterized. MkC1qDC-1 demonstrated the inhibition of HeLa cell proliferation and recognition of some cancer cell phenotypes in comparative analysis on several cell lines, suggesting biomedical potential of this protein.

Key words: bivalve mollusk, C1q domain, lectin, pattern recognition receptor, glycosylation profiling, cancer cell.

C1q domain-containing (C1qDC) proteins are a group of biopolymers involved in immune response as pattern recognition receptors (PRRs) in a lectin-like manner. A new protein MkC1qDC-1 from the hemolymph plasma of Modiolus kurilensis bivalve mollusk widespread in the Northwest Pacific was purified. The isolation procedure included ammonium sulfate precipitation followed by affinity chromatography on pectin-Sepharose. The study of the carbohydrate specificity of the M. kurilensis plasma and purified protein showed the strong inhibitory effect of uronic acids and their polysaccharides derivatives. Earlier, in a closely related species Modiolus modiolus from the North Atlantic new lectins were isolated using mucin-Sepharose and named modiolin H and E [1,2]. We showed that the protein MkC1qDC-1 isolated from Modiolus kurilensis is a differ from modiolins. The full-length MkC1qDC-1 sequence was assembled based on mass-spectrometry data supplemented with N-terminal Edman's degradation, and included 176 amino acid residues with molecular mass of 19kDa displaying high homology to bivalve C1qDC proteins. MkC1qDC-1 demonstrated antibacterial properties against gram-negative and gram-positive strains. MkC1qDC-1 binds to a number of saccharides in Ca^{2+}-dependent manner which characterized by structural meta-similarity in acidic group enrichment of galactose and mannose derivatives incorporated in diversified molecular species of glycans. Alginate, κ-carrageenan, fucoidan, and pectin were found to be highly-effective inhibitors of MkC1qDC-1 activity. Yeast mannan, lipopolysaccharide (LPS), peptidoglycan (PGN) and mucin showed an inhibitory effect at concentrations three orders of magnitude greater than for the indicated leaders. MkC1qDC-1 localized to the mussel hemal system and interstitial compartment. MkC1qDC-1 was found to suppress proliferation of human adenocarcinoma HeLa cells using high-content microscopy with time-lapse cell monitoring. Using fluorescent labelled MkC1qDC-1 we found its ability to recognize specifically some cancer cell phenotypes that can be potentially suitable for clinical diagnostics and for the development of targeted drug delivery nanosystems. These results indicate to the biomedical potential of MkC1qDC-1 protein.

This study was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (protein isolation and characterization - project no. 0657-2020-0004; mollusks sampling and cell-free hemolymph isolation and primary fractionation - project no. 121082600034-5).

References

1. *Tunkijjanukij S. et al. A heterogeneous sialic acid-binding lectin with affinity for bacterial LPS from horse mussel (Modiolus modiolus) hemolymph // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. – 1997. – V. 117. – P. 273–286.*
2. *Tunkijjanukij S., Olafsen J.A. Sialic acid-binding lectin with antibacterial activity from the horse mussel: further characterization and immunolocalization // Dev. Comp. Immunol. – 1998. – V. 22. – P. 139–150.*

УДК: 615.457.5, ББК: 52.81 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-88-90

ПОКРЫТЫЕ ХИТОЗАНОМ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫЕ ЧАСТИЦЫ КАК НОСИТЕЛИ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ В ТКАНИ ГЛАЗА

Е.В.Попова

МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1-11Б, popova.ekaterina1995@gmail.com, 89851151440

Покрытые хитозаном кальций-фосфатные частицы являются перспективными носителями для доставки низкомолекулярных лекарств в ткани глаза. Включение ингибитора ангиотензин-превращающего фермента эналаприлата в такие частицы увеличивает время удерживания препарата в слезе, повышает эффективность снижения внутриглазного давления и продлевает действие лекарства.

Ключевые слова: кальций-фосфатные частицы, хитозан, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента, внутриглазное давление, доставка в ткани глаза

Лечения заболеваний глаза наиболее часто проводят с использованием водных растворов препаратов. Однако при капельном введении действующего вещества в ткани глаза проникает менее 5% от введенной дозы. Повышение эффективности проникновения и длительности воздействия возможно с использованием различных систем доставки, в частности нано- и микрочастиц. Включение препарата в частицы позволяет значительно уменьшить дозу вводимого препарата и, следовательно, снизить риски возникновения побочных эффектов.

В данной работе мы оптимизировали условия получения и охарактеризовали частицы на основе фосфата кальция (CaP-частицы), покрытые положительно заряженным мукоадгезивным биополимером хитозаном (Рис. 1). Для этого использовано два вида хитозана: хитозан с молекулярной массой 5 кДа и гликоль-хитозан с молекулярной массой 72 кДа. В качестве включаемого в частицы офтальмологического препарата мы использовали ингибитор ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) эналаприлат, который способен снижать внутриглазное давление (ВГД).

Рисунок 1. Принципиальная схема синтеза CaP-частиц, содержащих эналаприлат и покрытых хитозаном.

Частицы, покрытые 5 кДа хитозаном, имели форму «стержня» и характеризовались средним гидродинамическим диаметром 180 нм и ζ-потенциалом +7 мВ. Частицы, покрытые 72 кДа хитозаном, имели неправильную шарообразную форму, средний диаметр 280 нм и ζ-потенциал +17 мВ. В то время как процент включения эналаприлата в непокрытые частицы составлял 40%, покрытие частиц хитозанами позволило увеличить эффективность включения до 70%. Полученные частицы сохраняли свои характеристики неизменными при хранении в виде коллоидного раствора при 4°C не менее двух месяцев. Изучение фазового состава образцов CaP-частиц без покрытия и с покрытием показало, что все образцы соответствовали аморфизованному гидроксиапатиту.

Эксперименты in vivo с использованием кроликов породы Шиншилла показали, что после однократного капельного введения в глаз эналаприлат в покрытых хитозаном CaP-частицах значительно дольше удерживается в слезной жидкости. Показано, что в результате однократного капельного введения в глаз происходит значительно более сильное снижение ВГД в случае эналаприлата в частицах, чем в случае водного раствора препарата, причем эффект сильнее выражен при использовании 72 кДа хитозана. Более того, введение эналаприлата в предложенные частицы позволило пролонгировать действие препарата на ВГД.

Финансирование: Работа поддержана МГУ имени М.В. Ломоносова (Тема Гос. регистрации АААА-А21-121011290089-4) и Фондом содействия инновациям (Договор №16362ГУ/2021 от 25.05.2021).

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-88-90

CHITOSAN-COATED CALCIUM PHOSPHATE PARTICLES AS CARRIERS FOR DRUG DELIVERY TO OCULAR TISSUES

E.Popova

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Russia, 119991, Moscow, Leninskiye gory, 1-11B

Chitosan-covered calcium phosphate particles are promising carriers for the delivery of low-molecular-weight drugs to ocular tissues. The inclusion of the angiotensin-converting enzyme inhibitor enalaprilat into these particles increases the retention time of the drug in the tear, enhances the effectiveness of intraocular pressure decrease, and prolongs the drug action.

Key words: calcium phosphate particles, chitosan, angiotensin-converting enzyme inhibitor, intraocular pressure, eye delivery

Treatment of eye diseases is most often carried out using aqueous solutions of drugs. However, with the dropwise administration of the active substance, less than 5% of the injected dose penetrates into the tissues of the eye. Increasing the efficiency of penetration and the duration of exposure is possible with the use of various delivery systems, in particular nano- and microparticles. The inclusion of the drug in the particles can significantly reduce the dose of the administered drug, and therefore reduce the risk of side effects.

In this work, we optimized the preparation conditions and characterized particles based on calcium phosphate (CaP-particles) coated with a positively charged mucoadhesive biopolymer chitosan (Fig. 1). For this, two types of chitosan were used: chitosan with a molecular weight of 5 kDa and glycol-chitosan with a molecular weight of 72 kDa. As an ophthalmic preparation included in the particles, we used an angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor enalaprilat, which can reduce intraocular pressure (IOP).

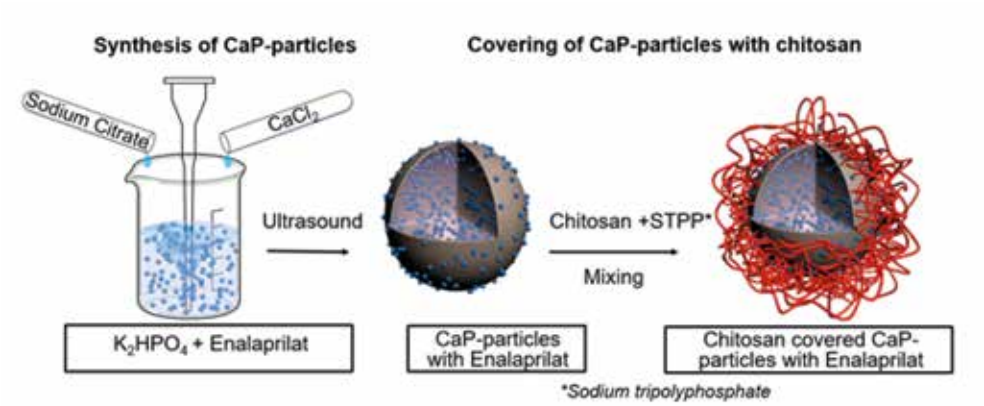


Figure 1. Principal scheme of the synthesis of enalaprilat-containing chitosan covered CaP-particles.

The particles coated with 5 kDa chitosan had the "rod" shape and were characterized by an average hydrodynamic diameter of 180 nm, and a ζ-potential of +7 mV. The particles coated with 72 kDa chitosan had an irregular spherical shape, an average diameter of 280 nm, and a ζ-potential of +17 mV. While the percentage of incorporation of enalaprilat into uncoated particles was 40%, coating the particles with chitosans made it possible to increase the inclusion efficiency up to 70%. The resulting particles retained their characteristics unchanged when stored as a colloidal solution at 4°C for at least two months. Investigation of the phase composition of uncoated and coated samples of CaP-particles showed that all samples corresponded to amorphized hydroxyapatite.

In vivo experiments using Chinchilla rabbits have shown that after a single instillation into the eye, enalaprilat in chitosan-coated CaP-particles is retained much longer in the tear fluid. It was shown that as a result of a single dropwise instillation into the eye, a significantly stronger decrease in IOP occurs in the case of enalaprilat loaded into particles than in the case of an aqueous solution of the drug, and the effect is more pronounced when using 72 kDa chitosan. Moreover, the loading of enalaprilat into the proposed particles made it possible to prolong the effect of the drug on IOP.

Grant: This work was supported by Lomonosov Moscow State University (Registration Theme AAAA-A21-121011290089-4) and by the Innovation Assistance Fund (contract №16362GU/2021 of 25.05.2021).

УДК 547.962:577.352.2:606:616-006 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-91-92

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОГО КОНЪЮГАТА МУТАНТНОГО ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДОМЕНА МЫШИНОГО РЕЦЕПТОРА PD-1

Рябухина Е.В., Рязанцев Д.Ю., Свирщевская Е.В., Водовозова Е.Л.

ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва
miss.katringet@yandex.ru

Получен липосомальный конъюгат мутантного экстрацеллюлярного домена мышиного рецептора PD-1 для ингибирования сигнального пути PD-1/PD-L1.

Ключевые слова: липосомы , ePD1(PD-1), ePD1_dM, PD-L1, E. coli , конъюгация, ПЭГ$_{16}$-малеимид.

Одним из подходов к иммунотерапии рака является ингибирование сигнального пути рецептора программируемой смерти лимфоцитов (PD-1). Связывание PD-1 с его лигандом PD-L1 на опухолевых клетках позволяет опухоли избежать Т-клеточного иммунного надзора. В настоящее время для ингибирования сигнального пути PD-1/PD-L1 в клинике применяется терапия моноклональными антителами. Однако, наряду с высокой стоимостью лечения, блокада антителами вызывает серьезные побочные эффекты, поскольку в норме лиганд PD-L1 экспрессирован на эпителиальных клетках и клетках крови для защиты от аутоиммунной Т-клеточной активации. Поэтому актуальным является поиск альтернативных путей ингибирования сигнального пути PD-1/PD-L1, которые позволят повысить селективность активации противоопухолевых Т-клеток. Нашей задачей стало конструирование липосом, несущих на поверхности множественные копии внеклеточного домена мышиного белка PD-1 (ePD1). Эффективность связывания липосом-скаффолдов с целевыми клетками будет обеспечиваться за счет поливалентных взаимодействий. Кроме того, известна тенденция накопления липосом в опухоли с хорошей васкуляризацией за счет эффекта повышенной проницаемости и удерживания (EPR, enhanced permeability and retention).

Ген PD-1 был клонирован из клеток мышиного лейкоза EL-4, амплифицирован, секвенирован и переклонирован в плазмидный вектор *Escherichia coli* (*E. coli*) PQE30. Для иммобилизации белка на липосомах был выбран метод тиол-малеимидной конъюгации. Мышиный ePD1 содержит три остатка цистеина. Чтобы сохранить ориентацию ePD1 относительно поверхности липосом, один цистеин был заменен на серин, а С-концевой метионин – на цистеин с помощью ПЦР со специфическими праймерами. Кроме того, для удаления N-концевого His-tag фрагмента, содержащего цистеин, был вставлен сайт щепления для Tev-протеазы. Спектры кругового дихроизма мутантного белка и исходного ePD1 не имели значительных различий. Для визуализации связывания с лигандом PD-L1, рекомбинантный ePD1_dM метили красителем Cy3. С помощью проточной цитометрии и конфокальной микроскопии показано связывание ePD1_dM с лигандом PD-L1, экспонированным на лимфоидных клетках EL-4 и эпителиальных клетках CT26.

Методом экструзии получали липосомы состава яичный фосфатидилхолин—холестерин—диолеоилглицерин, конъюгированный с малеимидной группой через спейсер ПЭГ$_{16}$ [1]. Липосомы конъюгировали с ePD1_dM и выделяли из реакционной смеси гель-хроматографией на колонке с сефарозой CL-4B. Средний размер липосом 130 нм. По предварительным оценкам, липосома несет до 200 молекул функционально активного мутантного ePD1.

Литература

1. *Tuzikov A.B., Ryabukhina E.V., Paramonov A.S., Chizhov A.O., Bovin N.V., Vodovozova E.L. A convenient route to synthesize conjugates of 1,2-diglycerides with functionalized oligoethylene glycol spacer arms. Mendeleev Commun. 2021, 31, 538–541.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-91-92

PREPARATION OF A LIPOSOMAL CONJUGATE OF THE MUTANT EXTRACELLULAR DOMAIN OF THE MOUSE PD-1 RECEPTOR

Ryabukhina E.V., Ryazantsev D.Yu., Svirshchevskaya E.V., Vodovozova E.L.

M.M. Shemyakin & Yu.A. Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, Moscow, Russia
miss.katringet@yandex.ru

Liposomal conjugate of the mutant extracellular domain of the mouse PD-1 receptor obtained to inhibit the PD-1/PD-L1 signaling pathway.

Keywords: liposomes, ePD1(PD-1), ePD1_dM, PD-L1, E. coli , conjugation, PEG_{16}-maleimide

One of the approaches to cancer immunotherapy is the inhibition of the signal pathway of the lymphocytic programmed cell death receptor 1 (PD-1). Binding of PD-1 to its PD-L1 ligand expressed on tumor cells suppresses the activity of T cells, which allows the tumor to avoid T-cell immune surveillance. Currently, monoclonal antibody therapy is used in the clinic to inhibit the PD-1/PD-L1 signaling pathway. However, along with the high cost of treatment, antibody blockade causes serious side effects, since normally the PD-L1 ligand is expressed on epithelial cells and blood cells to protect against autoimmune T-cell activation. Therefore, it is urgent to search for alternative ways to inhibit the PD-1/PD-L1 signaling pathway, which will increase the selectivity of activation of T cells in tumor. Our task was to construct liposomes that carry multiple copies of the extracellular domain of the mouse protein PD-1 (ePD1) on the surface. It is expected that the efficiency of binding of liposome scaffolds to target cells will be ensured by polyvalent interactions. In addition, the tendency for the accumulation of liposomes in tumors with good vascularization due to the effect of enhanced permeability and retention (EPR) can contribute to their targeted delivery.

Wild-type ePD-1 gene was obtained from EL-4 cell line, sequenced, amplified by PCR, and cloned into *E. coli* PQE30 vector. To immobilize the protein on liposomes, the method of thiol-maleimide conjugation was chosen. Mouse ePD1 contains three cysteine residues. To preserve the orientation of the protein relative to the liposome surface, one cysteine was substituted for serine, and the C-terminal methionine was substituted for cysteine. In addition, a cleavage site for the Tev protease was inserted to remove the N-terminal His-tag fragment containing cysteine. The CD spectra of the mutant protein and the original ePD1 do not have significant differences. To visualize binding to PD-L1 ligand, recombinant ePD1_dM was labeled with Cy3 dye. Using flow cytometry and confocal microscopy, the binding of ePD1_dM to the PD-L1 ligand exposed on EL-4 lymphoid cells and CT26 epithelial cells was shown.

Liposomes composed of egg phosphatidylcholine—cholesterol— conjugate of dioleoylglycerol with PEG_{16}-maleimide [1] were obtained by extrusion. Then, liposomes undergone conjugation with ePD1_dM and isolation by gel chromatography on a column with Sepharose CL-4B. The average size of liposomes was 130 nm. According to preliminary estimates, the liposome carries up to 200 molecules of functionally active mutant ePD1.

References

1. *Tuzikov A.B., Ryabukhina E.V., Paramonov A.S., Chizhov A.O., Bovin N.V., Vodovozova E.L. A convenient route to synthesize conjugates of 1,2-diglycerides with functionalized oligoethylene glycol spacer arms. Mendeleev Commun. 2021, 31, 538–541.*

УДК 544.77 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-93-94

НАНОЧАСТИЦЫ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА, ПОКРЫТЫЕ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ, КАК СРЕДСТВО ДОСТАВКИ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ИММУНО-, ХИМИО- И ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Семкина А.С.[1,2], **Скориков А.С.**[3], **Иванова А.В.**[4], **Островерхов П.В.**[5], **Габашвили А.Н.**[1,4], **Федотов К.А.**[4], **Мельников П.А.**[2], **Абакумов М.А.**[1,4], **Чехонин В.П.**[1,2]

[1] ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1
[2] ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России, Россия, 119034, Москва, Кропоткинский пер., д. 23
[3] EMAT - Антверпенский университет, Бельгия, B-2020, Антверпен, Груненборгерлан 171
[4] ФГАОУ НИТУ «МИСиС», Россия, 119991, Москва, Ленинский пр-т, д. 4
[5] ФГБОУ ВО «МИРЭА-РТУ», Россия, 119454, Москва, пр-т Вернадского, д. 78
e-mail: alevtina.semkina@gmail.com

Получена серия наноформуляций различных противоопухолевых соединений, загруженных на магнитные наночастицы маггемита, модифицированные сывороточным альбумином. Продемонстрирован значительный потенциал данных наночастиц в рамках различных подходов к терапии злокачественных новообразований.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, МРТ, онкология, контрастные агенты, альбумин, химиотерапия, иммунотерапия, фотодинамическая терапия

Магнитные наночастицы оксида железа (МНЧ) являются уникальными представителями класса наночастиц ввиду своей двойственной природы. С одной стороны они способны генерировать локальные возмущения магнитного поля при проведении МРТ, что приводит к увеличению контраста получаемых снимков и повышает эффективность диагностики различных заболеваний. С другой стороны, поверхность наночастиц оксида железа может быть модифицирована различными химическими соединениями, увеличивающими стабильность наночастиц, время их циркулирования в крови, а также тропность к определенным тканям. Наконец, на модифицированные наночастицы можно производить загрузку различных лекарственных препаратов, которые необходимо адресно доставить в клетки-мишени организма.

В рамках данного исследования в качестве покрытия использовался бычий или человеческий сывороточный альбумин (СА). Ввиду высокой гомологии этих белков, наночастицы обладают сходными физико-химическими и магнитными свойствами, которые были подробно охарактеризованы. МНЧ-СА обладают суперпарамагнитными свойствами, высокой стабильностью, низкой токсичностью, а также успешно проникают в живые клетки, в том числе опухолевые. Эффективность разработанных наночастиц в качестве контрастного агента была продемонстрирована на нескольких экспериментальных опухолях.

Терапевтический потенциал МНЧ-СА выражается в возможности загрузки различных лекарственных препаратов в оболочку наночастиц: химиопрепараты (доксорубицин, цисплатин), фотосенсибилизаторы (модифицированные бактериохлорины) и иммунопрепараты (CpG-олигонуклеотид, IL-12, LCL161). Все полученные системы были подробно охарактеризованы по своим физико-химическим и цитотоксическим свойствам, исследованы на предмет интернализации в живые клетки в условиях *in vitro* и поведения в организме экспериментальных животных в условиях *in vivo*. Кроме того, была показана возможность осуществления лиганд-опосредованной направленной доставки наночастиц к опухолевым клеткам с использованием моноклональных антител.

Использование МНЧ-СА позволило с помощью МРТ оценить временной интервал, соответствующий максимальному накоплению фотосенсибилизатора в опухоли, увеличив тем самым эффективность фотодинамической терапии на экспериментальной модели карциномы толстой кишки CT26 у мышей.

С помощью МНЧ-СА, загруженных иммунопрепаратами, удалось осуществить репрограммирование опухоль-ассоциированных макрофагов в провоспалительный M1-фенотип, что может свидетельствовать в пользу высокого иммунотерапевтического потенциала полученных наночастиц.

Таким образом, был разработан ряд наноформуляций терапевтических молекул различной природы, как для прямого цитотоксического действия на клетки опухоли, так и для воздействия на клетки стромы, составляющие ее микроокружение.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №18-29-09061.

UDC 544.77 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-93-94

MAGNETIC NANOPARTICLES COATED BY SERUM ALBUMIN AS A DELIVERY SYSTEM FOR IMMUNO-, CHEMO- AND PHOTODYNAMIC THERAPY DRUGS

Semkina A.S.[1,2], **Skorikov A.S.**[3], **Ivanova A.V.**[4], **Ostroverkhov P.V.**[5], **Gabashvili A.N.**[1,4], **Fedotov K.A.**[4], **Melnikov P.A.**[2], **Abakumov M.A.**[1,4], **Chekhonin V.P.**[1,2]

[1] *Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Russia, 117997, Moscow, Ostrovitianov str. 1*

[2] *NIITSPN V.P. Serbsky of the Ministry of Health of the RF, Russia, 119034, Moscow, Kropotkinsky lane 23*

[3] *EMAT – University of Antwerp, Antwerp, Belgium, B-2020, Antwerp, Groenenborgerlaan 171*

[4] *National Research Technological University "MISiS", Russia, 119049, Moscow, Leninskiy prospekt 4*

[5] *MIREA - Russian Technological University", Russia, 119454, Moscow, pr-t Vernadskogo 78*

e-mail: alevtina.semkina@gmail.com

A series of nanoformulations of various antitumor compounds loaded onto serum albumin modified magnetic maghemite nanoparticles was obtained. The significant potential of these nanoparticles in the framework of various malignant neoplasms therapy approaches was demonstrated.

Keywords: magnetic nanoparticles, MRI, oncology, contrast agents, albumin, chemotherapy, immunotherapy, photodynamic therapy.

Magnetic iron oxide nanoparticles (MNP) are the unique examples of nanovehicles due to their dual nature. On the one hand, they are capable of generating local magnetic field disturbances during MRI performing, which enlarges the obtained images contrast and increases the efficiency of various diseases diagnostics. On the other hand, the surface of iron oxide nanoparticles can be modified with various chemical compounds that increase the stability of nanoparticles, their blood circulation time, as well as their specificity to certain tissues. Finally, modified nanoparticles can be loaded by various drugs that need to be targeted to the certain cells within the body.

In this study, bovine or human serum albumin (SA) were used as a coating. Due to a high homology of these proteins, nanoparticles have similar physicochemical and magnetic properties, which were precisely characterized. MNP-SA have superparamagnetic properties, high stability, low cytotoxicity, and also successfully penetrate living cells, including tumor cells. The effectiveness of the developed nanoparticles as a contrast agent was demonstrated with several experimental tumors.

The therapeutic potential of MNP-SA is based on the possibility of loading various drugs into the nanoparticles shell: chemotherapy drugs (doxorubicin, cisplatin), photosensitizers (modified bacteriochlorins) and immunodrugs (CpG oligonucleotide, IL-12, LCL161). All synthesized systems were characterized in detail according to their physicochemical and cytotoxic properties, their internalization into living cells were studied in vitro and their behavior within the body of experimental animals was investigated in vivo. In addition, the possibility of ligand-mediated targeted nanoparticles delivery to tumor cells using monoclonal antibodies was shown.

The use of MNP-SA allowed applying MRI to evaluate the time interval of the maximum photosensitizer accumulation in the tumor. As a result, it increased the efficiency of photodynamic therapy of CT26 colon carcinoma experimental model in mice.

Using MNP-SA loaded by immunodrugs, we succeed to perform tumor-associated macrophages reprogramming into the pro-inflammatory M1 phenotype, which may indicate a high immunotherapeutic potential of the obtained nanoparticles.

Thus, a number of therapeutic molecules of various nature nanoformulations was developed, both for a direct cytotoxic effect on tumor cells and for affecting the stromal cells that make up the tumor microenvironment.

This study was supported by the RFBR grant №18-29-09061.

УДК 57.084.1 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-95-96

ПРИМЕНЕНИЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ BDNF И NT-3 ПРИ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ КИСТ СПИННОГО МОЗГА

Степанова О.В., Воронова А.Д., Чадин А.В., Фурса Г.А., Карсунцева Е.К., Валихов М.П., Семкина А.С., Решетов И.В., Чехонин В.П.

ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» МЗ РФ, Москва, Россия
119034, г. Москва, Кропоткинский пер., д. 23
e-mail: sms-34@yandex.ru

Были смоделированы посттравматические кисты спинного мозга крыс. Показано, что NT-3 усиливает эффективность применения обкладочных клеток человека при терапии экспериментальных кист спинного мозга.

Ключевые слова: нейротрофические факторы; обкладочные клетки; обонятельная выстилка; посттравматические кисты спинного мозга; клеточная терапия

Хирургические и медикаментозные методы малоэффективны при лечении хронических посттравматических кист спинного мозга, поэтому одним из развивающихся направлений лечения является клеточная терапия. Именно трансплантация клеток может способствовать регенерации нервной ткани, снижать риск нарушений после травмы спинного мозга посредством секреции клетками нейротрофических факторов [1]. Известно, что нейротрофические факторы, такие как нейротрофический фактор мозга (BDNF) и нейротрофин-3 (NT-3), вызывают нейропротективные эффекты, уменьшают дегенерацию аксонов и обеспечивают рост кортикоспинальных аксонов в спинном мозге после травмы [2]. Однако уровень экспрессии нейротрофических факторов в хронической фазе повреждения спинного мозга значительно снижен, и в этом случае важным представляется их экзогенное введение.

В данной работе была проведена оценка эффективности применения нейротрофических факторов BDNF и NT-3 при их совместной трансплантации с обкладочными клетками обонятельной выстилки человека в посттравматические кисты спинного мозга.

В исследовании были использованы образцы обонятельной выстилки, полученные при плановом хирургическом вмешательстве в Отделении пластической хирургии УКБ № 1. Обкладочные клетки обонятельной выстилки человека были получены по разработанным нами протоколам. Образование кисты подтверждали методом МРТ через 4 недели после экспериментальной травмы спинного мозга крыс. Обкладочные клетки в количестве 750 тысяч (n=10) и комбинированный препарат из того же количества клеток и нейротрофических факторов BDNF (n=10) и NT-3 (n=10), 500 нг. в образце, трансплантировали в область кист через 4 недели после травмы. Контрольной группе вводили среду без клеток (n=10). В течение 4 недель после трансплантации оценивали восстановление подвижности задних конечностей крыс, используя 21-балльную шкалу открытого поля (BBB).

Впервые показано, что NT-3 усиливает эффективность применения обкладочных клеток человека при терапии экспериментальных кист спинного мозга, при этом эффективность BDNF не была выявлена. Комбинированный препарат из обкладочных клеток человека и нейротрофических факторов в будущем может применяться в области нейрохирургии для лечения пациентов с посттравматическими кистами спинного мозга.

Работа выполнена при поддержке государственного задания № 056-00017-20-00 от 25.12.2019 г.

Литература

1. *Pearse D.D., Bunge M.B. Designing cell- and gene-based regeneration strategies to repair the injured spinal cord // J Neurotrauma. - 2006. -V. 23. - № 3. - P. 438–452.*

2. *Hiebert G.W., Khodarahmi K., McGraw J., Steeves J.D., Tetzlaff W. Brain-derived neurotrophic factor applied to the motor cortex promotes sprouting of corticospinal fibers but not regeneration into a peripheral nerve transplant // J Neurosci Res.- 2002.- V.15.- №69 (2).- P.160-168.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-95-96

APPLICATION OF NEUROTROPHIC FACTORS BDNF AND NT-3 IN CELL THERAPY OF EXPERIMENTAL POSTTRAUMATIC SPINAL CORD CYSTS

Stepanova O.V., Voronova A.D., Chadin A.V., Fursa G.A., Karsuntseva E.K., Valikhov M.P., Semkina A.S., Reshetov I.V.,Chekhonin V.P.

The Serbsky State Scientific Center for Social and Forensic Psychiatry, Moscow, Russia
119034, Moscow, Kropotkinskiy per., 23

The experimental post-traumatic spinal cord cysts were modeled. It has been shown that NT-3 enhances the effectiveness of the use of human olfactory ensheathing cells in the treatment of experimental spinal cord cysts.

Key words: neurotrophic factors; olfactory ensheathing cells; olfactory mucosa; post-traumatic spinal cord cysts; cell therapy

Surgical and medical methods are ineffective in the treatment of chronic post-traumatic spinal cord cysts, therefore, one of the developing method of treatment is cell therapy. It is cell transplantation that can promote the regeneration of nerve tissue, reduce the risk of disorders after spinal cord injury through the secretion of neurotrophic factors by cells [1]. It is known that neurotrophic factors, such as brain neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT-3), cause neuroprotective effects, reduce axonal degeneration, and promote the growth of corticospinal axons in spinal cord injury [2]. However, the neurotrophic factor expression level is significantly reduced in the chronic phase of spinal cord injury, and in this case, their exogenous administration seems to be important.

We evaluated the effectiveness of the neurotrophic factors BDNF and NT-3 use during their joint transplantation with the human olfactory ensheathing cells into post-traumatic spinal cord cysts. We used the samples of the olfactory mucosa obtained during planned surgery at the Plastic Surgery Department of the Clinical Hospital No. 1. The human olfactory ensheathing cells were obtained according to the protocols we developed. Cyst formation was confirmed by MRI 4 weeks after experimental rat spinal cord injury. The ensheathing cells in the amount of 750 thousand (n = 10) and a combined preparation of the same number of cells and neurotrophic factors BDNF (n = 10) and NT-3 (n = 10), 500 ng. in the sample, transplanted into the cyst area 4 weeks after injury. The control group was injected with a medium without cells (n = 10). The rat hind limb recovery was assessed using a 21-point open field scale (BBB) during 4 weeks after transplantation.

It was shown for the first time that NT-3 enhances the effectiveness of human ensheathing cells in the treatment of experimental spinal cord cysts, while the effectiveness of BDNF has not been revealed. A combined preparation of human olfactory ensheathing cells and neurotrophic factors may be used in the neurosurgery field to treat patients with post-traumatic spinal cord cysts in the future.

This work was supported by state assignment No. 056-00017-20-00 dated December 25, 2019.

References

1. *Pearse D.D., Bunge M.B. Designing cell- and gene-based regeneration strategies to repair the injured spinal cord // J Neurotrauma. - 2006. -V. 23. - № 3. - P. 438–452.*
2. *Hiebert G.W., Khodarahmi K., McGraw J., Steeves J.D., Tetzlaff W. Brain-derived neurotrophic factor applied to the motor cortex promotes sprouting of corticospinal fibers but not regeneration into a peripheral nerve transplant // J Neurosci Res.- 2002.- V.15.- №69 (2).- P.160-168.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-96-99

ПОИСК И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ЭЛЕКТРОНОАКЦЕПТОРОВ ДЛЯ L-ГАЛАКТОН-1,4-ЛАКТОН ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ARABIDOPSIS THALIANA

Чудин А.А., Кудряшова Е.В.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Химический факультет, кафедра химической энзимологии
e–mail: andrew_18@inbox.ru

Охарактеризованы природный (цитохром С) и искусственные электроноакцепторы (1,4-бензохинон, феназинметосульфат, тетраметилфенилен-диаммоний) и исследована возможность применения акцепторов для определения ферментативной активности L-галактон-1,4-лактон дегидрогеназы *Arabidopsis Thaliana* в водном растворе и в мицеллярной системе.

Ключевые слова: L-галактон-1,4-лактон дегидрогеназа; акцепторы электронов; ФАД-зависимые дегидрогеназы; обращенные мицеллы АОТ.

Исследование и поиск наиболее эффективных электроноакцепторов (ЭА) для ФАД-зависимых дегидрогеназ представляет несомненный интерес. Так, в большинстве коммерческих глюкометров электроноакцептор (чаще всего феррицианид) возвращает ФАД в исходное состояние, что генерирует отклик в виде электрического сигнала. Перспективно применение окислительно-восстановительных полимеров (например, на основе нафтохинона) в качестве ЭА для ФАД-зависимых дегидрогеназ в биотопливных элементах. Одним из представителей данного класса является модельный фермент L-галактон-1,4-лактон дегидрогеназа из *Arabidopsis Thaliana* (AtGALDH). Настоящая работа посвящена поиску и характеризации ЭА для L-галактон-1,4-лактон дегидрогеназы AtGALDH для выявления деталей механизма функционирования фермента, а также исследованию возможности применения данных ЭА для разработки метода определения активности AtGALDH в водном растворе и в мицеллярных системах, которые используются для исследования и сравнения мембранотропных свойств ферментов (дегидрогеназ) из различных источников.

В работе был охарактеризован ряд ЭА для AtGALDH в водной среде (25 мМ фосфатный буфер pH 8,9) и в системе обращённых мицелл АОТ (0,1 М раствор ди-(2-этил)-гексилового эфира сульфоянтарной кислоты в н-октане в широком интервале степеней гидратации) методом спектрофотометрии. Показано, что природный ЭА цитохром С, несмотря на максимальную разность молярных коэффициентов поглощения в окисленной и восстановленной форме 21000 $М^{-1}см^{-1}$ (λ = 550 нм), не может быть использован в системе обращённых мицелл (в отличие от водной среды), поскольку взаимодействует с мицеллярной матрицей, теряя кофактор, и утрачивает электроноакцепторные свойства. Для оптимизации условий определения активности фермента в системе обращенных мицелл в работе исследованы искусственные ЭА, используемые при определении ферментативной активности ряда дегидрогеназ, такие как 1,4-бензохинон (BQ) и феназинметосульфат (PMS) отдельно и в сочетании с индикатором дихлорфенолиндофенолом (DCPIP). Также был изучен ранее неописанный в литературе ЭА тетраметилфенилендиаммоний (TMDP). Результаты представлены ниже (табл.1).

Таблица 1. Параметры реакции при различных электроноакцепторах.

Акцептор электронов	pH	$V_{макс}/V_{фон}$	$K_{m\ (в\ воде)}$, M	$K_{m\ (в\ мицеллах)}$, M при степени гидратации W = 22
Цитохром С	8,8	460	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	Не функционирует
BQ	7,8	6	$(1,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$(2,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$
PMS	8,8	10	$(2,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(2,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$
PMS + DCPIP	8,8	160	$(3,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$(2,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$
TMDP	8,8	1,3	$(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(2,7 \pm 0,6) \cdot 10^{-4}$

Таким образом, нами был подобран ЭА феназинметосульфат, который в сочетании с DCPIP позволяет определять каталитические характеристики AtGALDH в водной и мицеллярной средах.

Литература

3. *Kudryashova E.V., Leferink N.G., Slot I.G., van Berkel W.J. Galactonolactone oxidoreductase from Trypanosoma cruzi employs a FAD cofactor for the synthesis of vitamin C // Biochim Biophys Acta. 2011 Vol. 1814, № 5. P. 545–552.*

4. *Leferink N.G.H., Heuts D.P., Fraaije M.W., van Berkel W.J.H.. The growing VAO flavoprotein family // Arch. Biochem. Biophys., 2008, V. 474. P. 292–301.*

5. *Loew N., Tsugawa W., Nagae D., Kojima K., Sode K. Mediator preference of two didifferent FAD-dependent glucose dehydrogenases employed in disposable enzyme glucose sensors // Sensors. 2017. Vol. 17, №11. P. 2636.*

6. *Milton R.D., Hickey D.P., Abdellaoui S., Lim K., Wu F., Tan B., Minteer S.D. Rational design of quinones for high power density biofuel cells // Chem Sci. 2015. Vol. 6, № 8. P. 4867–4875.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-96-99

SEARCH AND CHARACTERIZATION OF ELECTRONOACEPTORS FOR L-GALACTONE-1,4-LACTONE DEHYDROGENASE FROM ARABIDOPSIS THALIANA

Chudin A.A., Kudryashova E.V.

Chemical Faculty of Lomonosov Moscow State University, Department of Chemical Enzymology
e–mail: andrew_18@inbox.ru

Natural (cytochrome C) and artificial electron acceptors (1,4-benzoquinone, phenazine methosulfate, tetramethylphenylenediamine) were characterized, and the possibility of using the acceptors to determine the enzymatic activity of L-galactone-1,4-lactone dehydrogenase of *Arabidopsis Thaliana* in an aqueous solution and in a micellar system was investigated.

Key words: L-galactone-1,4-lactone dehydrogenase; electron acceptors; FAD-dependent dehydrogenases; AOT reversed micelles.

The study and search for the most effective electron acceptors (EA) for FAD-dependent dehydrogenases is of undoubted interest. For example, in most commercial glucometers, an electron acceptor (most often ferricyanide) returns the FAD to its initial state, which generates a response in the form of an electrical signal. The use of redox polymers (for example, based on naphthoquinone) as an EA for FAD-dependent dehydrogenases in biofuel cells is promising. One of the representatives of this class is the model enzyme L galactone-1,4-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis Thaliana* (AtGALDH). This work is devoted to the search and characterization of EA for L-galactone-1,4-lactone dehydrogenase AtGALDH to reveal the details of the mechanism of the enzyme functioning, as well as to study the possibility of using the EA for the development of a method for determination of the AtGALDH activity in an aqueous solution and in micellar systems that are used for research and comparison of membranotropic properties of enzymes (dehydrogenases) from various sources.

In this work, a number of EAs were characterized for AtGALDH in an aqueous medium (25 mM phosphate buffer pH 8.9) and in an AOT reverse micelles system (0.1 M solution of sulfosuccinic acid bis(2-ethylhexyl) ester in n-octane at wide range degrees of hydration) by spectrophotometry. It was shown that the natural EA cytochrome C, despite the maximum difference between the molar absorption coefficients in the oxidized and reduced forms of 21000 M^{-1} cm^{-1} (λ = 550 nm), cannot be applied in a reversed micelles system (in contrast to an aqueous medium), since interacts with the micellar matrix, losing the cofactor, and loses its electron-acceptor properties. To optimize the conditions for determination of the enzyme activity in the reverse micelles system, artificial EA used in the determination of the enzymatic activity of a number of dehydrogenases, such as 1,4-benzoquinone (BQ) and phenazine methosulfate (PMS), were studied separately and in combination with the indicator dichlorophenolindophenol (DCPIP). The previously undescribed EA tetramethylphenylenediamine (TMDP) was also studied. The results are presented below (table 1).

Table 1. Reaction parameters for various electron acceptors.

Electron acceptor	pH	$V_{max}/V_{background}$	$K_{m\ (in\ water)}$, M	$K_{m\ (in\ micelles)}$, M at hydration degree W = 22
Cytochrome C	8,8	460	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	It doesn't function
BQ	7,8	6	$(1,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$(2,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$
PMS	8,8	10	$(2,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(2,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$
PMS + DCPIP	8,8	160	$(3,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$(2,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$
TMDP	8,8	1,3	$(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(2,7 \pm 0,6) \cdot 10^{-4}$

Thus, we have selected EA phenazine methosulfate, which, in combination with DCPIP, makes it possible to determine the catalytic characteristics of AtGALDH in aqueous and micellar media.

References

1. *Kudryashova E.V., Leferink N.G., Slot I.G., van Berkel W.J. Galactonolactone oxidoreductase from Trypanosoma cruzi employs a FAD cofactor for the synthesis of vitamin C // Biochim Biophys Acta. 2011 Vol. 1814, № 5. P. 545–552.*

2. Leferink N.G.H., Heuts D.P., Fraaije M.W., van Berkel W.J.H.. The growing VAO flavoprotein family // Arch. Biochem. Biophys., 2008, V. 474. P. 292–301.

3. Loew N., Tsugawa W., Nagae D., Kojima K., Sode K. Mediator preference of two didifferent FAD-dependent glucose dehydrogenases employed in disposable enzyme glucose sensors // Sensors. 2017. Vol. 17, №11. P. 2636.

4. R.D., Hickey D.P., Abdellaoui S., Lim K., Wu F., Tan B., Minteer S.D. Rational design of quinones for high power density biofuel cells // Chem Sci. 2015. Vol. 6, № 8. P. 4867–4875.

УДК: 576.535.5 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-99-101

НАНОМЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР ГЛИОМ С МУТАЦИЕЙ IDH1 R132H КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ОНКОДИАГНОСТИКИ.

Шмелев М. Е., Гулая В. С., Романишин А. О. Фарниев В. М., Швед Н. А., Кумейко В. В.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет»
Россия, 690080, г. Владивосток, ул. Космонавтов, д. 25, кв. 22
e-mail: shmelev.m.e@gmail.com

Фено- и генотипирование клеток опухолей различного генеза дает незаменимую информацию для таргетной терапии. Нами выявлены наномеханические свойства живых клеток первичных культур глиом, имеющих мутацию IDH1 R132H, позволяющие дифференцировать их от клеток, не имеющих данную мутацию, что необходимо при персонализированной терапии данных заболеваний.

Ключевые слова: глиобластома, атомно-силовая микроскопия, иммуноцитохимия, CD44, IDH1 R132H, первичные клеточные линии.

Классификация и характеристика образцов и клеток опухолей необходимы для прогнозирования динамики заболевания, а также для выбора стратегии терапии в клинической практике. С помощью генетических тестов выявляют критические для диагностики мутации, являющиеся маркерными или драйверными. Однако генетических данных недостаточно для создания протокола эффективной персонализированной терапии для конкретного пациента из-за ряда эпигенетических факторов и их комбинированного сочетания [2]. В качестве дополнительного метода, позволяющего морфо-функционально охарактеризовать прогностически значимый статус трансформированной злокачественным ростом ткани, мы предлагаем подход наномеханического картирования первичных культур клеток из образцов, полученных при нейрохирургических операциях. В нашем исследовании, применяя сканирование высокого разрешения с помощью АСМ мы сравнили несколько первичных культур клеток глиом и определили особенности, ассоциированные с генотипом по ключевому маркерному гену, рекомендованному ВОЗ для дифференциальной диагностики глиом.

Клинический диагноз для образцов опухолей был предоставлен Медицинским центром ДВФУ, включая маркеры для исследования скорости малигнизации для исключения метастазов [1]. Клеточная культура считалась стабильной после трех пассажей и достижения общего количества клеток около 15 миллионов.

Геномный анализ проводили методом Сэнгера, при этом как образцов опухолей, так и культивированных клеток, чтобы доказать, что клетки сохраняют тот же генотип с теми же мутациями в процессе культивирования.

Анализ наномеханических свойств клеток выполняли с помощью атомно-силового микроскопа Bruker BioScope Resolve (США). Анализ силовых кривых проводили по DMT-модели, которая рекомендована для анализа деформации образца на величину меньше радиуса зонда [3].

В результате исследований установили, что наличие мутации IDH1 R132H сильно влияет на наномеханические свойства культивируемых клеток глиомы. Клетки дикого типа продемонстрировали примерно в 2 раза меньшую жесткость и значения модуля Юнга: мутантные клетки глиомы показали жесткость 5,119-7,573 мн/м и модуль Юнга - 36,97-42,281 кПа, в то время как для дикого типа жесткость составила 3,519- 3,965 мн/м, а модуль Юнга – 26,384-29,499 кПа.

Предложенный подход в перспективе может быть применим для комбинированной клинической дифференциально диагностики глиом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Проект №0657-2020-0004).

Литература

1. *Абсалямова О. В. и др. Клинические рекомендации по лечению первичных опухолей центральной нервной системы //Клинические рекомендации обсуждены и утверждены на заседании Правления Ассоциации нейрохирургов России. – 2013. – Т. 20.*
2. *Louis D. N. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary //Acta neuropathologica. – 2016. – Т. 131. – №. 6. – С. 803-820.*
3. *Pashley M. D. Further consideration of the DMT model for elastic contact //Colloids and surfaces. – 1984. – Т. 12. – С. 69-77.*

УДК: 576.535.5 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-99-101

NANOMECHANICAL PROPERTIES OF GLIOMA CELLS WITH IDH1 R132H MUTATION IN PRIMARY CULTURES AS PROSPECTIVE MARKERS FOR ONCODIAGNOSTICS.

Shmelev M.E., Gulaya V.S., Romanishin A.O. Farniev V.M., Shved N.A., Kumeiko V.V.

Far Eastern Federal University
690080 Vladivostok, Russia, Kosmonavtov str. 25 apt. 22
e-mail: shmelev.m.e@gmail.com

Phenotyping and genotyping of tumor cells of various genesis provides irreplaceable information for targeted therapy. We have revealed the nanomechanical properties of living cells of cultures of primary cell lines of gliomas with the IDH1 R132H mutation, which make it possible to differentiate them from cells that do not have this mutation, which is necessary for personalized therapy of these diseases.

Key words: glioblastoma, atomic force microscopy, immunocytochemistry, CD44, IDH1 R132H, primary cell lines.

The classification and characterization of tumor samples and cells are necessary to predict the disease prognosis, as well as to choose the therapy strategy in clinical practice. The goal of genetic test is identifying the specific mutations in genes which are the key factors in pathology, they are also called driver mutations. However, it is not enough to provide efficient target personalized therapy for each person due to the multiple genetic and its combinations [2]. As an additional method we considered a nanomechanical properties research in primary cultures of glioma cells from samples which are obtained during neurosurgical operations. In our study we compared several primary glioma cell lines.

The clinical diagnosis for de-identified patient samples and differential diagnosis was provided by FEFU Medical Center. It contained several markers for investigation the rate of malignization, for excluding the metastasis [1]. A cell line was considered stable after three passages and reaching total cell count approximately 15 millions cells.

Genomic analysis was performed via Sanger method. Genomic DNA was extracted as well as from tumor samples and the cultivated cells to prove that cells still have the same genotype with the same mutations.

Nanomechanical cell analysis was performed via atomic force microscope BioScope Resolve by Bruker (USA). Force curves analysis was carried out by DMT-model, which is required to analyse sample deformation by amount less than probes radius [3].

We found that the presence of the IDH1 R132H mutation strongly affected the nanomechanical properties of cultured glioma cells. Cells without mutations demonstrated approximately 2-fold lower stiffness and Young's modulus values: mutant glioma cells displayed stiffness 5.119-7.573 mn/m and Young's modulus - 36.97-42.281 kPa, for wild-type stiffness was 3.519-3.965 mn/m and Young's modulus 26.384 -29.499 kPa.

The proposed approach can be applied in the future for combined clinical differential diagnosis of gliomas.

This work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Project No. 0657-2020-0004).

References

3. *Absalyamova O. V. et al. Clinical guidelines for the treatment of primary tumors of the central nervous system // Clinical guidelines were discussed and approved by the Board of the Association of Neurosurgeons of Russia. - 2013 .-- T. 20.*
4. *Louis D. N. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary //Acta neuropathologica. – 2016. – T. 131. – №. 6. – C. 803-820.*
5. *Pashley M. D. Further consideration of the DMT model for elastic contact //Colloids and surfaces. – 1984. – T. 12. – C. 69-77.*

УДК 615.032.13 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-101-104

НАНОДИСПЕРСИИ ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ: ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ

В.А. Щелконогов[1,2,3], А.М. Иншакова[1], Е.С. Дарнотук[1], А.В. Шипелова[1], Н.С.Шастина[1], О.А. Баранова[2,3], А.В. Чеканов[2,3], К.Д. Казаринов[3], Э.Ю. Соловьева[2], А.И. Федин[2]

[1] *МИРЭА-Российский технологический университет (ИТХТ им. М.В. Ломоносова), РФ, Москва, 119571, пр. Вернадского, д.86, e-mail: vasiliy9999@yandex.ru*
[2] *ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова Минздрава России. ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, РФ, 117997.*
[3] *Фрязинский филиал ФГБУН «Институт радиотехники и электроники имени В. А. Котельникова» РАН. пл. Введенского, д. 1, Московская область, г. Фрязино, РФ.*

Были получены различные нанодисперсии (липосомы и наноэмульсии) с липоевой кислотой (ЛК), с размером частиц от 50 до 250 нм, характеризующиеся 80±10% эффективностью включения (ЭВ) ЛК в наночастицы (НЧ), её медленным высвобождением из наноформ, а также обладающие высокой стабильностью при длительном хранении при комнатной температуре. Было показано, что наночастицы содержащие ЛК подавляют агрегацию тромбоцитов (Тц), обусловленную арахидоновой кислотой и предложен механизм антиагрегационного действия.

Ключевые слова: липоевая кислота, нанодисперсии, тромбоциты, арахидоновая кислота, продукты пероксидации липидов.

Цереброваскулярные заболевания относятся к числу наиболее распространенных форм патологии ЦНС с высоким показателем летальных исходов [1]. К основным патогенетическим механизмам развития ишемии головного мозга относят воспалительные реакции, возникновение и прогрессирование окислительного стресса, нарушения сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостазов, деструкцию ГЭБ и другие [2,3]. Терапия данной патологии включает применение препаратов, подавляющих воспалительные процессы, проявляющих антиоксидантное действие и препятствующих образованию тромбов. Одним из наиболее универсальных и перспективных антиоксидантов в комплексной терапии инсульта является липоевая кислота. Однако, она малорастворима в воде и, попадая в организм, быстро связывается с белками и биодеградирует под действием различных ферментов, быстро выводится из организма что приводит к уменьшению антиоксидантного и терапевтического действия.

Поэтому **целью данной работы** является разработка разных нанодисперсий с ЛК, для солюбилизации ЛК в водных растворах, их пролонгированного высвобождения, защиты от биодеградации при попадании в организм, а также исследование их влияния на функциональную активность тромбоцитов.

Вначале получали нанодисперсии с ЛК (липосомы и наноэмульсии). Липосомы (Лс) с ЛК получали из фосфатидилхолина (ФХ) пассивной загрузкой, диспергируя липидную плёнку фосфатно-солевым буферным раствором (ФБР, pH 7.4) с последующей экструзией. Наноэмульсии «масло-в-воде» с ЛК получали методом ультразвукового диспергирования после инжекции ФБР и стабилизатора, в органическую фазу, содержащую ЛК и ФХ. Затем удаляли органический растворитель и избыток воды при пониженном давлении. ζ-потенциал, размер, и индекс полидисперсности (ИП) НЧ определяли методом электрофоретического и динамического светорассеяния.

Таким образом были получены фосфатидилхолиновые липосомы с ЛК и наноэмульсии с ЛК на основе ФХ, Плюроника Ф68, олигоглицерина (ОГ), ФХ и Ф68, ОГ и Ф68 в ФБР (pH 7.4) с размером частиц от 50 до 250 нм.

Разработанные наночастицы были электронейтральными (значения поверхностного заряда не превышали -5.5±3.5 мВ). Нанодисперсии с липоевой кислотой на основе Плюроника Ф68 и олигоглицерина были гетерогенными (ИП>0.3) и состояли из двух фракций НЧ: 50-70 нм (20-25%) и 160-250 нм (75-80%). Полученные результаты связаны с образованием мицелл стабилизаторов (Ф68 и ОГ) при озвучивании размер которых был менее 100 нм. Более того, было обнаружено, что полеченные наноформы с ЛК были стабильными при длительном хранении (более 24 месяцев) при комнатной температуре. При сравнении характеристик, полученных наноформ с ЛК (Лс и НЭ) было обнаружено, что в наноэмульсиях удалось солюбилизировать ЛК в 1.5 раза, использовав максимальную концентрацию ЛК 7 мг/мл, в то время как для получения липосом с ЛК использовали концентрации 1 и 5 мг/мл. При дальнейшем повышении количества ЛК (7–15 мг/мл) в липосомах происходило выпадение ЛК в осадок и образовывались нестабильные дисперсии с размером частиц более микрона. При этом, удалось добиться достаточно высокой эффективности включения (ЭВ) ЛК в наноэмульсиях, равной 90±3%, в то время как ЭВ ЛК в липосомах составляла 75-80%.

С помощью крио-ПЭМ и ЭМ была изучена морфология наночастиц. Было обнаружено, что ФХ-липосомы в основном представляют с собой гомогенную систему, состоящую из однослойных везикул сферической формы частиц. В свою очередь наноэмульсии на основе ФХ представляют систему, состоящую из однослойных и мультислойных наноструктур, практически одинакового размера.

Затем изучали кинетику высвобождения ЛК из наночастиц при помощи диффузионной ячейки Франца, загружая в донорную камеру НЭ или липосомы, а в акцепторный отсек – ФБР. В результате исследований было обнаружено, что из липосом за 24 ч высвободилось 45±3% ЛК, а из НЭ не более 55%. Такой процесс высвобождения ЛК из НД может обеспечить пролонгированное действие активной фармацевтической субстанции и длительное поддержание её терапевтической концентрации в крови.

На следующем этапе работы оценивали влияние полученных наноформ ЛК на агрегацию тромбоцитов (Тц), в плазме крови, выделенной из крови, полученной у здоровых доноров, методом оптической агрегатометрии. В качестве индуктора агрегации Тц использовали арахидоновую кислоту (АК) поскольку в результате её действия образуются различные метаболиты в том числе и продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ). В ходе проведенных исследований, было установлено, что липосомы с ЛК (1-2мМ) подавляют агрегацию тромбоцитов на 30-45% относительно контроля. Все типы нанодисперсий с ЛК (1-4 мМ) эффективней на 40-85% подавляли агрегацию Тц, обусловленную АК. Водорастворимые препараты и наночастицы без ЛК практически не оказывали влияния на агрегацию Тц. По-видимому, наноформы с ЛК способны лучше проникать внутрь клеток за счет взаимодействия липидов с мембраной клеток или в результате рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Антиоксидантное действие наноформ ЛК оценивали по содержанию тиобарбиатурат активных продуктов (ТБК-АП) и активных форм кислорода (АФК) в образцах обогащенной Тц плазмы (ОТП), инкубированных с АК. В результате было показано, что в процессе агрегации Тц, обусловленной АК, происходит окисление липидов в ОТП. Добавление всех типов НД с ЛК к образцам плазмы крови приводило к значительному уменьшению количества ТБК-АП (5-20 раз) и АФК (в 2-5 раз). Наиболее эффективным антиоксидантным действием обладали все типы НЭ с ЛК при использовании максимальной концентрации ЛК. Кроме того, было обнаружено, что и водорастворимая форма ЛК и НЧ без ЛК, незначительно влияли на образование продуктов ПОЛ и АФК в плазме крови, при активации Тц с помощью АК. Предполагаемым механизмом антиагрегационного действия ЛК наноформ можно считать ингибирование ею процесса инициирования продуктов пероксидации липидов и АФК с помощью АК.

Таким образом на основании полученных результатов научной работы можно сделать заключение о том, что все типы нанодисперсий с липоевой кислотой являются перспективными для дальнейших исследований по оценке их антикаогулянтного и нейропротекторного действия на различных экспериментальных моделях *in vivo*.

Исследования выполнены в рамках Государственного задания (№ гос. регистрации АААА-В20-22009-1790054-9).

Литература

1. *Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. // М.: "Медицина", 2001, 328 с.*
2. *Щелконогов В.А., Дарнотук Е.С., Чеканов А.В., Баранова О.А. и др. Липосомальный препарат с карнозином и липоевой кислотой: получение, антиоксидантные и антиагрегантные свойства. // Биофизика, 2021, Т. 66, № 39, С. 329-337*
3. *Benjamin E.J., Virani S.S., Callaway C.W., Chamberlain A.M., Chang A.R., Cheng S., Chiuve S.E., Cushman M., Delling F.N., Deo R., et al. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American Heart Association. // Circulation, 2018, V. 137, № 12, P. 67-492.*

UDK 615.032.13 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-101-104

NANODISPERSIONS OF LIPOIC ACID: PRODUCTION AND STUDY OF INFLUENCE ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF PLATELETS

V.A. Shchelkonogov[1,2,3], A.M. Inshakova[1], E.S. Darnotuk[1], Shipelova A.V.[1], N.S. Shastina[1], O.A. Baranova[2,3], A.V. Chekanov[2,3], K.D. Kazarinov[3], E.Y. Solovieva[2], A.I. Fedin[2]

[1] *MIREA-Russian technological University (ITHT M.V. Lomonosov), 119571, Russia, Moscow, Vernadsky prospectus, 86, e-mail: vasiliy9999@yandex.ru*
[2] *Pirogov Russian National Research Medical University, 117997, Moscow, RF, Ostrovitianov str. 1.*
[3] *Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics, RAS (Fryasino branch), 141190, Fryazino, Moscow region, Vvedensky sq. 1.*

Various nanodispersions (liposomes and nanoemulsions) with lipoic acid (LA) with size of particles 50-250 nm were obtained and characterized by 80±10% encapsulation efficiency (EI) of LA into NPs, its slow release from nanoconstructions, and possessing stability during long-term storage at room temperature. It was revealed that liposomes and LA NPs inhibit platelet aggregation caused by arachidonic acid, and the mechanism of antiplatelet action was proposed.

Key words: lipoic acid, nanodispersions, platelets, arachidonic acid, lipid peroxidation.

Cerebrovascular diseases are among the most common forms of CNS pathology with a high rate of fatal outcomes [1]. The main pathogenetic mechanisms of the cerebral ischemia are inflammatory reactions, the occurrence and progression of oxidative stress, disorders of vascular-platelet and coagulation hemostasis, destruction of the BBB, and others [2,3]. Therapy of its pathology includes using of drugs that suppress inflammatory processes, exhibit an antioxidant effect and prevent the formation of blood clots. One of the most versatile and promising antioxidants in the complex therapy of brain stroke is lipoic acid. However, it is poorly soluble in water and, once in the plasma, quickly binds to proteins and biodegrades under the action of various enzymes, is quickly excreted from the body, which leads to the decrease in the antioxidant and therapeutic effect.

Therefore, **the purpose of this work** is to develop different nanodispersions (NDs) with LA, for the solubilization of LA in aqueous solutions, prolonged release, protection from biodegradation, as well as to study their effect on the functional activity of platelets.

Initially, nanodispersions with LA (liposomes and nanoemulsions) were obtained. Drugs with LA were developed from phosphatidylcholine (PC) by passive loading, dispersing the lipid film with a phosphate-salt buffer solution (PBS, pH 7.4) with subsequent extrusion. Oil-in-water NEs with LA were obtained by ultrasonic dispersion after injection of PBS and stabilizer into an organic phase containing LA and PC. Then the organic solvent and excess water were removed at reduced pressure. ζ-the potential, size, and polydispersity index (PDI) of the NPs were determined by electrophoretic and dynamic light scattering.

Thus, phosphatidylcholine liposomes (Ls) with LA and nanoemulsions with LA based on PC, Pluronic F68, oligoglycerin (OG), PC and F68, OG and F68 in PBS (pH 7.4) with a particle size from 50 to 250 nm were obtained. The developed nanoparticles were electron-neutral (the values of the surface charge did not exceed -5.5±3.5 mV). NDs with lipoic acid based on Pluronic F68 and oligoglycerin were heterogeneous (PDI>0.3) and consisted of two NPs fractions: 50-70 nm (20-25%) and 160-250 nm (75-80%). The obtained results are associated with the formation of stabilizer micelles (F68 and OG) with a sounding size of less than 100 nm. Moreover, it was found that the treated nanoforms with LA were stable during long-term storage (more than 24 months) at room temperature When comparing the characteristics of nanoforms with LA (Ls and NEs), it was established that in nanoemulsions it was possible to solubilize LA by 1.5 times, using a maximum concentration of LA of 7 mg/ml, while concentrations of 1 and 5 mg/ml were used to obtain liposomes with LA. With the further increase in the amount of LA (7-15 mg/ml) in the liposomes, LA precipitated and unstable dispersions with particle size of more than a micron were formed. At the same time, it was possible to achieve a sufficiently high efficiency of inclusion (EI) of LA in nanoemulsions, equal to 90±3%, while the EI of LC in liposomes was 75-80%.

The morphology of nanoparticles was studied using cryo-PEM and EM. It was found that PC liposomes are mainly a homogeneous system consisting of single-layer vesicles of spherical particles. In turn, PC-based nanoemulsions represent a system consisting of single-layer and multi-layer nanostructures of almost the same size.

Then, the kinetics of the release of LA from nanoparticles was studied using the Franz diffusion cell, loading NEs or liposomes into the donor chamber, and the PBS into the acceptor chamber. As a result of the studies, it was revealed that 45±3% of LA was released from Ls in 24 h, and no more than 55% from NEs. Such process of release

of LA from NDs can provide a prolonged effect of the active pharmaceutical substance and long-term maintenance of its therapeutic concentration in the blood.

At the next stage of the work, the effect of the LA nanoforms on platelet aggregation (Pt) in plasma isolated from blood, obtained from healthy donors, was evaluated by optical aggregatometry. Arachidonic acid (AA) was used as an inducer of Pt aggregation, since as a result of its action, various metabolites are formed, including products of lipid peroxidation (LPP). In the course of the conducted studies, it was found that liposomes with LA (1-2mM) inhibit platelet aggregation by 30-45% relative to the control. Nanodispersions with LA (1-4 mM) were 40-85% more effective in suppressing Pt aggregation due to AA. Water-soluble form of LA and nanoparticles without LA had practically no effect on the aggregation of Tc. Apparently, LA nanoforms is able to better penetrate into cells due to the interaction of lipids with the cell membrane or as a result of receptor-mediated endocytosis.

The antioxidant effect of LA nanoforms was evaluated by the content of thiobarbiaturate active products (TBAP) and reactive oxygen species (ROS) in samples of Pt poor plasma (PPP) incubated with AA. As a result, it was shown that in the process of aggregation of Pt caused by AA, lipid oxidation occurs in PPP. The addition of NDs with LA plasma samples led to the significant decrease in the amount of TBAP (5-20 times) and ROS (2-5 times). All types of NEs with LA had the most effective antioxidant effect when using the maximum concentration of LA. In addition, it was established that both the water-soluble form of LA and NPs without LA had a slight effect on the formation of LPP and ROS in plasma, when Pt was activated by AA. The proposed mechanism of the antiplatelet action of LA nanoforms can be considered as its inhibition of the process of initiation of lipid peroxidation products and ROS, caused by AA.

Thus, based on the obtained results of research work, it can be concluded that all types of nanodispersions with lipoic acid are promising for further studies to assess their anticaogulant and neuroprotective effects on various experimental models *in vivo*.

The research was carried out within the framework of the State task (state registration No. AAAA-B20-220091790054-9).

References

1. *Gusev E.I., Skvortsova V.I. Cerebral ischemia. // M.: "Medicine", 2001, 328 p.*
2. *Shchelkonogov V. A., Darnotuk E. S., Chekanov A.V., Baranova O.A., et. al. Liposomal Drug with Carnosine and Lipoic Acid: Preparation, Antioxidant and Antiplatelet Properties. // Biophysics, 2021, Vol. 66, No. 39, P 278-285.*
3. *Benjamin E.J., Virani S.S., Callaway C.W., Chamberlain A.M., Chang A.R., Cheng S., Chiuve S.E., Cushman M., Delling F.N., Deo R., et al. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American Heart Association. // Circulation, 2018, V. 137, № 12, P. 67-492.*

УДК 577.112.083 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-104-106

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА ЧЕЛОВЕКА НАТИВНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В КАЧЕСТВЕ ВЕКТОРА ДЛЯ ОНКОТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ, И ОЦЕНКА ЕГО ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Моллаев М.Д., Никольская Е.Д., Сокол М.Б., Моллаева М.Р., Фомичева М.В., Яббаров Н.Г.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия
119334, Москва, Косыгина 4
marvint@inbox.ru

В работе описывается разработка метода получения, очистки и выделения рекомбинантного рецептор-связывающего домена альфа-фетопротеина человека нативной последовательности и оценка его функциональной активности в качестве векторной молекулы для специфического транспорта в опухолевые клетки.

Ключевые слова: альфа-фетопротеин, векторная молекула, рекомбинантный белок, рефолдинг, противоопухолевый.

В России в 2018 году зафиксировано около 625 тыс. случаев злокачественных новообразований, что на 4% больше, чем в 2016 году. К сожалению, эффективность медикаментозного лечения онкологических заболеваний может быть ограничена высокой токсичностью препаратов и возникновением побочных эффектов. В связи с чем, актуальным направлением является разработка высокоэффективных противоопухолевых препаратов, обладающих адресным действием и низкой неспецифической токсичностью.

Альфа-фетопротеин (АФП) – онкофетальный белок, используемый в настоящее время в тест-системах для диагностики онкологических заболеваний. Также было показано, что многие линии опухолевых клеток экспрессируют рецепторы АФП. Ранее уже была доказана эффективность применения нативного и рекомбинантного АФП в качестве векторной молекулы для создания адресных систем доставки. Однако, помимо транспортной, АФП обладает и множеством регуляторных функций, что может осложнить его применение. В связи с этим, больший интерес представляет его рецептор-связывающий домен (АФП3Д). Получение рекомбинантного АФП3Д, не содержащего аффинной метки в своем составе, является актуальной задачей, поскольку наличие последних в составе белков терапевтического назначения значительно усложняет доклинические испытания, из-за необходимости проведения дополнительных токсикологических тестов.

Целью данного исследования являлось получение рекомбинантного 3 домена АФП с 376 по 609 а.к. с аналогичной нативной последовательностью. На начальном этапе исследования был получен вектор на основе плазмиды pET28a(+) содержащий последовательность кодирующую указанный белок. Экспрессия белка осуществлялась в E. coli BL21DE3 при индукции ИПТГ. рАФП3Д экспрессировался в виде телец включения. Оптимальным буфером для отмывки телец включения был 50 mM Трис-HCl с 0,5% дезоксихолевой кислотой, при использовании которого происходило наиболее полное вымывание примесей. Для проведения рефолдинга рАФП3Д солюбилизировали в буфере на основе гуанидина и Трис-HCl в восстанавливающих условиях. Наиболее оптимальным для получения биологически активного белка явился рефолдинг методом прямого разведения. В качестве следующего этапа очистки было использовано высаливание примесей с помощью 40% (NH4)2SO4. На завершающем этапе была подобрана система очистки при помощи хроматографии гидрофобных взаимодействий: для этого супернатант после высаливания наносили при высокой ионной силе элюента на колонку. В качестве буфера для нанесения образца использовали 50 mM Трис с 40% $(NH_4)_2SO_4$. Элюирование примесей и белка-интереса проводили при постепенном снижении ионной силы раствора. В качестве элюирующего буфера использовали 50 mM Трис с 0.2M $(NH_4)_2SO_4$ и в отсутствии последнего соответственно, чем достигали практически полного отделения от примесей.

Аутентичность третичной структуры рАФП3Д была показана с помощью ИФА с использованием антител к рецептор-связывающему домену полноразмерного АФП, а также исследованием соотношения вторичных структур с помощью кругового дихроизма в сравнении с нативным АФП. Меченный рАФП3Д селективно поглощался опухолевыми клетками линии MCF7. Эти данные свидетельствуют о том, что полученный рАФП3Д может быть использован для адресной доставки препаратов в опухолевые клетки и ткани.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-104-106

OBTAINING OF RECOMBINANT NATIVE SEQUENCE HUMAN ALPHA-FETOPROTEIN RECEPTOR-BINDING DOMAIN AS A VECTOR FOR ONCOTHERAPY AND DIAGNOSTICS, AND EVALUATION ITS FUNCTIONAL ACTIVITY

Mollaev M.D., Nikolskaya E.D., Sokol M.B., Mollaeva M.R., Fomicheva M.V., Yabbarov N.G.

Emanuel Institute of Biochemical Physics, RAS, Moscow, Russia
119334, Moscow, 4 Kosygin street
marvint@inbox.ru

The paper describes the expression, purification and isolation of native sequence human alpha-fetoprotein recombinant receptor-binding domain and evaluation its functional activity for specific targeting to tumor cells.

Key words: alpha-fetoprotein, vector molecule, recombinant protein, refolding, antitumor.

During 2018 in Russia 625 thousand cases of malignant neoplasms were recorded, which is 4% more than in 2016. Unfortunately, the effectiveness chemotherapeutic is limited with high toxicity and side effects. The development of highly effective antitumor characterized with targeted effect and low nonspecific toxicity is more than modern trend, but exigency.

Alpha-fetoprotein (AFP) is an oncofetal protein currently used in test systems for the cancer diagnosis. Many tumor cell lines have shown AFP receptors high expression levels. Previously, the native and recombinant AFP were successfully applied as a vector molecules for cancer targeting. However, besides transport, AFP provide some regulatory functions, which can complicate its application. Due to this reason, AFP receptor-binding domain (AFP3D) represents great interest. Obtaining a recombinant AFP3D that lacks affinity tags is an urgent task, since the presence of the latter in the composition of therapeutic proteins significantly complicates preclinical tests, due to the need for additional toxicological tests.

During this study the recombinant AFP3D with sequence from 376 to 609 a.a. of native AFP was obtained. At the initial stage, the pET28a(+) plasmid containing a sequence encoding the the protein was synthesized. The protein was expressed in E. coli BL21DE3 under lac promoter control. rAFP3D was expressed in inclusion bodies. The optimal buffer for washing the inclusion bodies was 50 mM Tris-HCl with 0.5% deoxycholic acid, with allowed to almost completely remove side products. For refolding, rAFP3D was solubilized in a buffer based on guanidine and Tris-HCl under reducing conditions. The most optimal method for obtaining biologically active protein was refolding by direct dilution. The next stage of purification was the desalting of impurities using 40% $(NH_4)_2SO_4$. At the final stage, the protein was purified using hydrophobic chromatography: the supernatant was applied to the butyl-sepharose column after desalting at a high ionic strength. 50 mM Tris with 40% (NH4)2SO4 was used as a washing buffer. The elution of the impurities and the protein of interest was carried out with a gradual decrease of the solution ionic strength. Initial elution with 0.2 M $(NH_4)_2SO_4$ in 50 mM Tris allowed to achieve complete separation from impurities. The pure rAFP3D was eluted with pure 50 mM Tris.

The authenticity of the tertiary structure of rAFP3D was demonstrated by ELISA using antibodies to the receptor-binding domain of full-size AFP, as well as by studying the ratio of secondary structures using circular dichroism in comparison with native AFP. Labeled rAFP3D is selectively internalized by MCF7 tumor cells. These data suggest that the resulting rAFP3D can be used for targeted drug delivery into tumor cells and tissues.

УДК 577.15 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-106-108

ПОЛУЧЕНИЕ ПОПЕРЕЧНО-СШИТЫХ АГРЕГАТОВ КАТАЛАЗЫ НА ОСНОВЕ ВАТЕРИТНОЙ МАТРИЦЫ

Тагирова М.А., Еремеев Н.Л. , Балабушевич Н.Г., Володькин Д., Клячко Н.Л.

*Московский государственный университеа имени М.В. Ломоносова,
Химический факультет, кафедра химической энзимологии.
Москва, 119991, Ленинские Горы д. 1, стр. 11б, Россия.
e-mail: mashxurat@mail.ru*

Разработана методика синтеза поперечно-сшитых агрегатов каталазы обработкой каталазы, включенной в поры матрицы ватерита, глутаровым альдегидом и последующим растворением неорганического ядра. Полученные агрегаты имеют сферическую форму с узким распределением частиц по размерам и высокую удельную активность фермента.

Ключевые слова: ватерит, CLEAs, соосаждение, каталаза, иммобилизованные ферменты, глутаровый альдегид, ЭДТА.

Техника межмолекулярного сшивания белков позволяет получать так называемые «иммобилизованные препараты ферментов в отсутствие матрицы-носителя». Процесс сшивания проводят с осадками, получаемыми из белковых растворов осаждением высокими концентрациями неорганических солей или органическими растворителями. Такие препараты получили название «поперечно-сшитые агрегаты ферментов» (cross-linked_enzyme aggregates - CLEAs) [1]. К достоинствам CLEAs можно отнести простоту процедуры, когда иммобилизация и очистка комбинированы в одну стадию, а также относительно низкую стоимость биокатализатора, связанную с отсутствием носителя [2]. Эти преимущества обуславливают применение CLEAs в промышленных процессах. Недостатками CLEAs являются значительный разброс частиц по размерам, а также высокая концентрация фермента в препарате и существенное снижение активности ферментов при формировании белковых осадков, что приводит к возникновению внутри диффузионных затруднений для транспорта субстрата [3].

Потенциальным путем преодоления вышеуказанных недостатков может являться синтез CLEAs вну-

три некоторой пористой матрицы с ее последующим удалением. Весьма перспективным в этой связи выглядит ватерит – одна из полиморфных форм карбоната кальция [4]. Однородные по размерам сферические микрочастицы ватерита можно получить при контролируемом сливанием растворов $CaCl_2$ и Na_2CO_3, а их пористая структура обеспечивает одновременное включение в матрицу различных белков. Неорганическое ядро в дальнейшем легко растворяется хелатирующими агентами.

Таким образом, целью настоящей работы является синтез CLEAs каталазы сферической формы с узким распределением по размерам и высокой остаточной удельной активностью фермента на основе ватеритной матрицы.

Включение каталазы в ватерит осуществляли соосаждением растворов $CaCl_2$ и Na_2CO_3 в присутствии фермента. После промывки образовавшихся микросфер ватерита от не включившейся каталазы проводили обработку глутаровым альдегидом с последующей отмывкой от избытка бифункционального агента и растворением ядра раствором ЭДТА.

Полученные CLEAs имеют сферическую форму (оптическая микроскопия) и однородны по размерам (средний диаметр аналогичен диаметру микросфер ватерита, сканирующая электронная микроскопия). Удельная активность каталазы после растворения ядра определяется концентрацией и способом добавления ЭДТА. В оптимальных условиях растворения ватеритной матрицы удельная активность каталазы в CLEAs всего в 2 раза меньше удельной активности нативной каталазы (табл.1).

Таблица 1. Сравнительная характеристика микрочастиц CLEAs

	Средний диаметр, мкм	Активность, ед/мг
Ватерит	3 ± 1	-
Каталаза	-	12800 ± 600
CLEAs	3.5 ± 1	6100 ± 900

Работа выполнена при финансовой поддержке Госрегистрационной темы АААА-А21-121011290089-4. Использовано оборудование, закупленное по Программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова.

Литература

1. *R. Schoevaart et al. Preparation, optimization and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). Biotechnol. Bioeng., 2004, V.87, P.754-762.*
2. *R.A. Sheldon. Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts. Org. Process Res.Dev., 2011, V.15, P.213-223.*
3. *I. Roy et al. Cross-linked enzyme aggregates for applications in aqueous and nonaqueous media. Humana Press, New-York, 2017, P.109-123.*
4. *D.V. Volodkin, et.al. Matrix Polyelectrolyte Microcapsules: New System for Macromolecule Encapsulation. Langmuir 2004, V.20, P.3398-3406.*

UDC 577.15 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-106-108

PREPARATION OF CATALASE CROSS-LINKED ENZYME AGGREGATES ON THE BASE OF VATERITE MATRIX

Tagirova M.A., Eremeev N.L., Balabushevich N.G., Volodkin D., Klyachko N.L.

Department of Chemical Enzymology, School of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia. 1/11b, Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia.
e-mail: mashxurat@mail.ru

A procedure has been developed for the synthesis of cross-linking aggregates of catalase by treatment with glutaraldehyde incorporated into the pores of the vaterite matrix and subsequent dissolution of the inorganic core. The resulting aggregates have a spherical shape with a narrow particle size distribution and a high specific activity of the enzyme.

Keywords: vaterite, CLEAs, co-synthesis, catalase, immobilized enzymes, glutaraldehyde, EDTA.

The technique of intermolecular cross-linking of proteins allows one to obtain the so-called "immobilized preparations of enzymes in the absence of a carrier matrix." The crosslinking process is carried out with precipitates obtained from protein solutions by precipitation with high concentrations of inorganic salts or organic solvents. Such drugs are called "cross-linked_enzyme aggregates" (CLEAs) [1]. The advantages of CLEAs include the simplicity of the procedure, when immobilization and purification are combined in one stage, as well as the relatively low cost of the biocatalyst due to the absence of a carrier [2]. These advantages lead to the use of CLEAs in industrial processes. The disadvantages of CLEAs are a significant scatter of particles in size, as well as a high concentration of the enzyme in the preparation and a significant decrease in the activity of enzymes during the formation of protein precipitates, which leads to diffusion difficulties for substrate transport inside [3].

A potential way to overcome the above disadvantages may be the synthesis of CLEAs inside some porous matrix with its subsequent removal. Vaterite, one of the polymorphic forms of calcium carbonate, looks very promising in this regard [4]. Spherical vaterite microparticles of uniform size can be obtained by controlled merging of $CaCl_2$ and Na_2CO_3 solutions, and their porous structure ensures the simultaneous incorporation of various proteins into the matrix. The inorganic core is readily soluble by chelating agents.

Thus, the aim of this work is to synthesize CLEAs catalase based on a spherical vaterite matrix with a narrow size distribution with a high residual specific activity of the enzyme.

The incorporation of catalase into vaterite was carried out by co-synthesis of $CaCl_2$ and Na_2CO_3 solutions in the presence of an enzyme. After the formed vaterite microspheres were washed from the unincorporated catalase, treatment with glutaraldehyde was carried out, followed by washing from the excess of the bifunctional agent and dissolving the core with an EDTA solution.

The obtained CLEAs have a spherical shape (optical microscopy) and are uniform in size (the average diameter is similar to that of vaterite microspheres, scanning electron microscopy). The specific activity of catalase after the dissolution of the core is determined by the concentration and method of adding EDTA. Under optimal conditions for dissolution of the vaterite matrix, the specific activity of catalase in CLEAs is only half the specific activity of native catalase (table 1).

Table 1. Comparative characteristics of microparticles CLEAs

	Average diameter, μm	Activity, u/mg
Vaterite	3 ± 1	-
Catalase	-	12800 ± 600
Catalase	3.5 ± 1	6100 ± 900

This work was supported by the State Registration Topic - AAAA-A21-121011290089-4. Used equipment purchased under the Development Program of the M.V. Lomonosov Moscow State University.

<u>Literature</u>

1. *R. Schoevaart et al. Preparation, optimization and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). Biotechnol. Bioeng., 2004, V.87, P.754-762.*
2. *R.A. Sheldon. Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts. Org. Process Res.Dev., 2011, V.15, P.213-223.*
3. *I. Roy et al. Cross-linked enzyme aggregates for applications in aqueous and nonaqueous media. Humana Press, New-York, 2017, P.109-123.*
4. *D.V. Volodkin, et.al. Matrix Polyelectrolyte Microcapsules: New System for Macromolecule Encapsulation. Langmuir 2004, V.20, P.3398-3406.*

НОВЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ: ТЕРМОГЕЛИОКС, ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МАГНИТО-РЕЗОНАНСНАЯ ТОМОГРАФИЯ, СУПЕРКОМПЬЮТЕРНЫЕ ВЫЧИСЛЕНИЯ

NEW PHYSICO-CHEMICAL MÉDECINE-BIOLOGICAL TECHNOLOGIES: THERMOHELIOCS, FUNCTIONAL MAGNETIC RESONANCE TOMOGRAPHY, SUPERCOMPUTERING

1. ИЗМЕНЕНИЯ pH И КОНЦЕНТРАЦИЙ МЕТАБОЛИТОВ В МОЗГЕ ЧЕЛОВЕКА
ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛЕГКОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ
ПО ДАННЫМ ЛОКАЛИЗАЦИОННОЙ ПРОТОННОЙ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ
Буланов П.А., Семенова Н.А., Ахадов Т.А., Манжурцев А.В.,
Яковлев А.Н., Ублинский М.В., Меньщиков П.Е. 111

CHANGES IN pH AND CONCENTRATIONS OF METABOLITES IN THE HUMAN BRAIN UNDER
THE INFLUENCE OF MILD TRAUMATIC BRAIN INJURY ACCORDING
TO LOCALIZATION PROTON MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY
Bulanov P.A., Semenova N.A., Akhadov T.A., Manzhurtsev A.V., Yakovlev A.N., Ublinsky M.V., Menshchikov P.E. 111

2. ИНГАЛЯЦИИ ТЕРМИЧЕСКИМ ГЕЛИОКСОМ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СИНДРОМА
ДЫХАТЕЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПРИ ОСТРОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ
Ким Т.Г., Чучалин А.Г., Гусев Е.И., Мартынов М.Ю., Шогенова, Л.В., Панин А.А. 112

INHALATION WITH THERMIC HELIOX FOR THE TREATMENT
OF RESPIRATORY FAILURE SYNDROME IN ACUTE ISCHEMIC STROKE
Kim T.G., Chuchalin A.G., Gusev E.I., Martynov M.Yu., Shogenova, L.V., Panin A.A. 113

3. СУПЕРКОМПЬЮТЕРНОЕ МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СЛОЖНЫХ
КИНЕТИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ КАТАЛИЗА И ФАРМОКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ ХОЛИНЭСТЕРАЗ
Лущекина С.В., Массон П., Махаева Г.Ф. Петров К.А.,
Григоренко Б.Л., Немухин А.В., Варфоломеев С.Д. 115

SUPERCOMPUTER MOLECULAR MODELING FOR RESEARCH ON COMPLEX
CATALYC REACTIONS AND PHARMOCOLOGICAL PROBLEMS OF CHOLINESTEASES
Lushchekina S.V., Masson P., Makhaeva G.F., Petrov K.A.,
Grigorenko B.L., Nemukhin A.V., Varfolomeev S.D. 115

4. ЗРИТЕЛЬНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ИЗМЕНЯЕТ СООТНОШЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ УЧАСТНИКОВ
ГЛУТАМИН-ГЛУТАМАТНОГО ЦИКЛА В АКТИВИРОВАННОЙ КОРЕ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА
Манжурцев А.В., Семенова Н.А., Яковлев А.Н., Ублинский М.В., Ахадов Т.А. 116

VISUAL STIMULATION CHANGES THE RATIO OF CONCENTRATIONS OF PARTICIPANTS
OF THE GLUTAMINE-GLUTAMATE CYCLE IN THE ACTIVATED HUMAN CEREBRAL CORTEX
Manzhurtsev A.V., Semenova N.A., Yakovlev A.N., Ublinsky M.V., Akhadov T.A. 117

5. МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ГЛУТАМАТКАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ – УЧАСТНИКА ПОЛИФЕРМЕНТНОЙ ЦЕПИ N-АЦЕТИЛАСПАРТАТА
Немухин А.В., Хренова М.Г., Кривицкая А.В. 117

MODELING REACTION MECHANISM OF GLUTAMATE CARBOXYPEPTIDASE – A MEMBER OF THE POLYENZYME CHAIN OF N-ACETYLASPARTATE
Nemukhin A.V., Khrenova M.G., Krivitskaya A.V. 118

6. ВЛИЯНИЕ ТЕРМОГЕЛИОКСА НА ПРОТЕОМНЫЙ СОСТАВ КОНДЕНСАТА ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА
Рябоконь А.М., Шогенова Л.В., Кононихин А.С., Козырь А.С., Панин А.А., Варфоломеев С.Д., Чучалин А.Г. 119

THERMOHELIOX INFLUENCE ON THE PROTEOMIC COMPOSITION OF EXHALED BREATH CONDENSATE
Ryabokon A. M., Shogenova L. V., Kononikhin A. S., Kozyr A. S., Panin A. A., Varfolomeev S. D., Chuchalin A.G. 120

7. ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА PGH-СИНТАЗЫ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ BOLD-СИГНАЛА В ЗРИТЕЛЬНОЙ КОРЕ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВИДЕОСТИМУЛЯЦИИ ПО ДАННЫМ ФМРТ ИССЛЕДОВАНИЯ
М.В. Ублинский, Н.А. Семенова, А.В. Манжурцев, А.Н. Яковлев, Т.А. Ахадов, С.Д. Варфоломеев 121

THE EFFECT OF ACETYLSALICYLIC ACID ON INTENSTITY OF BOLD SIGNAL IN HUMAN VISUAL CORTEX DURING VIDEO STIMULATION. FMRI STUDY
M.V. Ublinskiy, N.A. Semenova, A.V. Manzhurtsev,, A. N. Yakovlev, T.A. Akhadov, S.D. Varfolomeev 122

8. ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ФОСФОТРИЭСТЕРАЗ, ГИДРОЛИЗУЮЩИХ ОРГАНОФОСФАТЫ С ИНАКТИВИРОВАННОЙ УХОДЯЩЕЙ ГРУППОЙ
Мулашкина Т.И., Кулакова А.М., Хренова М.Г. 122

STRUCTURAL FEATURES OF PHOSPHOTRIESTERASES HYDROLYZING ORGANOPHOSPHATES WITH AN INACTIVATED LEAVING GROUP
Mulashkina T.I., Kulakova A.M., Khrenova M.G. 123

9. КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ МЕДИЦИНСКИМИ ГАЗАМИ И РЕСПИРАТОРНОЙ ПОДДЕРЖКОЙ У ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРКАПНИЧЕСКОЙ ДЫХАТЕЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ПРИ ОБОСТРЕНИИ ХОБЛ
Т.Т. Чьюнг, Шогенова Л.В., Селимир Д.С., Панин А.А., Чучалин А.Г. 123

COMBINED THERAPY WITH MEDICAL GASES AND RESPIRATORY SUPPORT IN PATIENTS WITH HYPERCAPNIC RESPIRATORY FAILURE WITH EXACERBATION OF COPD
T.T. Truong, Shogenova L.V., Selimir D.S., Panin A.A., Chuchalin A.G. 124

10. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МАГНИТНО- РЕЗОНАНСНАЯ ТОМОГРАФИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ ВЛИЯНИЯ ТЕРМОГЕЛИОКСА НА ГЕМОДИНАМИКУ ВОЗБУЖДЕНОЙ ЗРИТЕЛЬНЫМ СИГНАЛОМ ЗОНЫ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА
А.Н. Яковлев, Н.А. Семенова, М.В. Ублинский, Т. А. Ахадов, В.И. Быков, А. А.Панин, С.Б. Цыбенова, С. Д. Варфоломеев 125

FUNCTIONAL MAGNETIC RESONANCE TOMOGRAPHY IN STUDYING THE INFLUENCE OF THERMOHELIOX ON HEMODYNAMICS OF THE HUMAN CEREBRAL CORTEX EXCITED BY THE VISUAL STIMULUS
A. Yakovlev, N. Semenova, M. Ublinskiy, T. Akhadov, V. Bykov, A. Panin, S. Tsybenova, S. Varfolomeev 125

УДК 621.039.75 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-111-112

ИЗМЕНЕНИЯ PH И КОНЦЕНТРАЦИЙ МЕТАБОЛИТОВ В МОЗГЕ ЧЕЛОВЕКА ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛЕГКОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ ПО ДАННЫМ ЛОКАЛИЗАЦИОННОЙ ПРОТОННОЙ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Буланов П.А.[1], **Семенова Н.А.**[1,2,3,4], **Ахадов Т.А.**[1,3], **Манжурцев А.В.**[1,2,3], **Яковлев А.Н.**[2,3,4], **Ублинский М.В.**[2,3], **Меньщиков П.Е.**[2]

[1] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[2] *Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН*
[3] *НИИ неотложной детской хирургии и травматологии*
[4] *Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Российская Федерация*

Магнитно-резонансная спектроскопия (МРС) является единственным методом, позволяющей in vivo изучать биохимические процессы в норме и патологии. Цель исследования - выявление влияние легкой черепно-мозговой травмы (лЧМТ) на концентрации важнейших церебральных метаболитов, и значения pH в мозге человека по данным ^{1}H МРС.

Ключевые слова: МРТ, функциональная МРТ, легкая черепно-мозговая травма, сотрясение мозга.

Магнитно-резонансная спектроскопия (МРС) является единственным методом, позволяющей in vivo изучать биохимические процессы в норме и патологии. Цель исследования - выявление влияние легкой черепно-мозговой травмы (лЧМТ) на концентрации важнейших церебральных метаболитов, и значения pH в мозге человека по данным ^{1}H МРС. лЧМТ не сопровождается видимыми с помощью современных методов визуализации (МРТ, КТ) анатомическими изменениями, однако в 30% случаев приводит нарушениям поведения. Одной из главных задач исследования было определение концентраций основных нейромедиаторов, возбуждающего глутамата (Glu) и тормозного гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), разрешенные сигналы которых в ^{1}H МРС спектрах мозга не удается получить без разработки специальных методов.

В исследовании участвовали 16 пациентов с лЧМТ (сканирование проводилось в острой фазе – до 3 дней после травмы на аппарате Philips Achieva dStream 3.0T), средний возраст составлял 15 ± 3 года, и 17 здоровых добровольцев того же возраста, составляющих контрольную группу. Область интереса располагался в затылочной доле мозга. Для разделения сигналов Glu и глутамина применяли усреднение спектров с различными временами эха TE (TE-averaged PRESS), для определения [ГАМК] - спектральное редактирование, основанное на эффекте спин-спинового взаимодействия (MEGA-PRESS). Значения pH измеряли по величине химических сдвигов δ сигналов H2 и H5 имидазольных колец гистидина и гомокарнозина (δ ~7 м.д.).

При лЧМТ найдено достоверное ($p<0.05$) повышение [ГАМК] на 13±6%, выявлена достоверная ($p<0.05$) линейная корреляция Glu-mI, отсутствующая в норме, обнаружено статистически достоверное ($p<0.05$) снижение pH 1.2±0.4%. Обсуждаются возможные физико-химические механизмы обнаруженных эффектов лЧМТ и их связь с нарушениями поведения.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-111-112

CHANGES IN PH AND CONCENTRATIONS OF METABOLITES IN THE HUMAN BRAIN UNDER THE INFLUENCE OF MILD TRAUMATIC BRAIN INJURY ACCORDING TO LOCALIZATION PROTON MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY

Bulanov P.A.[1], **Semenova N.A.**[1,2,3,4], **Akhadov T.A.**[1,3], **Manzhurtsev A.V.**[1,2,3], **Yakovlev A.N.**[2,3,4], **Ublinsky M.V.**[2,3], **Menshchikov P.E.**[2]

[1] *Lomonosov Moscow State University*
[2] *N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences*
[3] *Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology*
[4] *N.N. Semenov Institute of Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

Magnetic resonance spectroscopy (MRS) is the only method that allows in vivo study of biochemical processes in norm and pathology. The aim of the study was to identify the effect of mild traumatic brain injury (mTBI) on the concentrations of the most important cerebral metabolites and pH values in the human brain according to ^{1}H MRC data.

Keywords: MRI, functional MRI, mild traumatic brain injury, concussion.

Magnetic resonance spectroscopy (MRS) is the only method that allows in vivo study of biochemical processes in norm and pathology. The aim of the study was to identify the effect of mild traumatic brain injury (craniocerebral trauma) on the concentrations of the most important cerebral metabolites and pH values in the human brain according to ^{1}H MRC. mTBI is not accompanied by anatomical changes visible with the help of modern imaging methods (MRI, CT), however, in 30% of cases it leads to behavioral disorders. One of the main objectives of the study was to determine the concentrations of the main neurotransmitters, excitatory glutamate (GLU) and inhibitory gamma-aminobutyric acid (GABA), whose permitted signals in the ^{1}H MRC spectra of the brain cannot be obtained without the development of special methods.

The study involved 16 patients with mTBI (scanning was carried out in the acute phase – up to 3 days after injury on a Philips Achieva DStream 3.0T device), the average age was 15 ± 3 years, and 17 healthy volunteers of the same age who made up the control group. The area of interest was located in the occipital lobe of the brain. Averaging of spectra with different TE echo times (TE-averaged PRESS) was used to separate Glu and glutamine signals, and spectral editing based on the spin-spin interaction effect (MEGA-PRESS) was used to determine [GABA]. The pH value was measured according to the value of the chemical shifts δ signals H2 and H5 imidazole rings of histidine and homocarnosine (δ ~7 M. D.).

In mTBI was found statistically significant ($p<0.05$) increase in [GABA] by 13±6% of the identified significant ($p<0.05$) linear correlation Glu-mI, absent in normal, statistically significant ($p<0.05$) decrease in pH 1.2±0.4%. The possible physico-chemical mechanisms of the detected effects of mTBI and their connection with behavioral disorders are discussed.

УДК616.24-008.46-85.816 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-112-114

ИНГАЛЯЦИИ ТЕРМИЧЕСКИМ ГЕЛИОКСОМ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СИНДРОМА ДЫХАТЕЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПРИ ОСТРОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

Ким Т.Г., Чучалин А. Г., Гусев Е. И., Мартынов М. Ю., Шогенова, Л. В., Панин А.А.

Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова, Российская Федерация, г. Москва, 105077, ул. 11-я Парковая, д.32, корпус 4, кафедра госпитальной терапии педиатрического факультета, e-mail: tnkim@mail.ru

Синдром дыхательной недостаточности часто развивается вследствие развития острого инсульта, но не всегда диагностируется и лечится. Предложен новый способ лечения этого синдрома, позволяющий улучшить течение и прогноз острого инсульта.

Ключевые слова: синдром дыхательной недостаточности при остром ишемическом инсульте, гипоксемия, термический гелиокс, гиперлактатемия.

Синдром дыхательной недостаточности, проявляющийся гипоксемией, гиперлактатемией, десатурацией, эпизодами ночных апноэ, аспирацией, пневмониями, часто осложняет острый ишемический инсульт и приводит к тяжелому клиническому течению и плохому реабилитационному прогнозу. Гипоксемия является ведущим клиническим признаком дыхательной недостаточности, и ее коррекция имеет большое значение для течения и исхода самого инсульта1.

Цель: оценить безопасность и эффективность термического гелиокса (tHe/O_2 ингаляции -70-75/ 30-25%, T-45-60 °C) в сравнении с ингаляциями медицинским кислородом (FiO_2 – 40%) для лечения синдрома дыхательной недостаточности у больных острым ишемическим инсультом.

Материалы и методы: 165 пациентов с острым ишемическим инсультом были рандомизированы на

2 группы. Пациентам 1-й группы (tHe/O_2, 91 пациентов, средний возраст 65±11,0; 54 мужчина, 37 женщин) проводили ингаляции t-He/O_2 (70-75/30-25%, T-45-60°C, "HELIOX EXTREME", Россия) 3 раза в день по 15 минут каждая. Больные 2-й группы (O_2, кислород, 30 больных, средний возраст 67±12,0 года; 34 мужчин, 30 женщин) получали O_2 по 15 мин 3 раза в сутки. Оценку неврологического статуса, функции внешнего дыхания и транспорта кислорода проводили до и после ингаляции tHe/O_2 и O_2 на 1-й, 3-й, 6-й, 10-й и 90-й день после инсульта.

Результаты: 90 из 91 пациентов в группе He/O_2 имели благоприятный функциональный исход (хорошее восстановление, умеренная инвалидизация) по шкале оценки тяжести инсульта NiHHS, модифицированной шкале Рэнкина, мобильности Ривермид по сравнению с пациентами из группы, получавших кислородотерапию на 3-е 6-е и 10-е сутки. Исходно балл по шкале NiHHS составил 7±2 в 1-й группе He/O_2 и 8±1 в группе O_2. На 10-е сутки шкала NiHHS в группе He/O_2 составила 3±2 балла, а в группе O_2-4±2 балла. Исходно оценка по модифицированной шкале Рэнкина (mRS) составила 3±1 балла в He/O_2 и в группе O_2 3±1. На 10-е сутки в группе He/O_2 mRS составил 1±1 балл, в группе O_2 2±1 балл. Исходно балл по шкале Ривермид составил 7±3 в группе tHe/O_2 6+2 и 7±2 в группе O_2. На 10-е сутки в группе tHe/O_2 оценка составила 12±3 балла, в группе O_2-8±3 балла. Показатели функции внешнего дыхания (FVC/FEV_1, FEV_1) значительно улучшались у пациентов группы tHe/O_2, чем в группе O_2. Исходно FVC составлял 1,5±1 л % от должного в группе He/O_2, группе O_2 и 1,8±1 л % от должного; на 10-е сутки в группе tHe/O_2 и 3,8±1 в группе O_2 и 2,8±1 л % от должного. Исходно FEV_1 составлял 250±150 мл % от должного в группе tHe/O_2, 300±150 мл от должного в группе O_2. На 10-й день в группе He/O_2 1500±200 мл от должного, в группе O_2 500±200 мл от должного. FVC/FEV_1 был в группе He/O_2 75±10% от должного в группе O2 70±10% от должного; на 10-е сутки в группе tHe/O2 85±10% от должного, в O_2 80±10% от должного. Параметры транспорта кислорода (paO_2, pvO_2, pcO_2, лактат) также были достоверно выше с 1-го дня лечения в группе t-He/O_2. Первоначально PaO_2 составлял 65±3 мм рт.ст. в группе He/O_2, 67±3 мм рт. ст. в группе O_2. На 10-е сутки tHe/O_2 94±7 мм рт ст, в группе O_2 80±7 мм рт ст. Венозный pO_2 составил 21,2 ± 3 мм рт ст в группе tHe/O_2, в группе O_2 23,2±3. На 10й день tHe/O_2 33±3,6 в O_2 23±3,5 мм рт pO2 капиллярной крови 78,4 ± 5 мм рт ст в tHe/O2, в группе O2 80,2±4 мм рт ст; на 10-е сутки в 1-й группе 99,5±1, во 2-й группе 82±1 мм рт. ст. Первоначально артериальный лактат составлял 3,5±2 мм рт ст в tHe/O_2, 3,6±2 мм рт ст в группе O_2. На 10 день, в tHe/O_2 1,2±1 мм р. ст, в группе O_2-2.5±1 мм рт.

Выводы: Ингаляции т-He/O_2 являются эффективным методом лечения синдрома дыхательной недостаточности в составе комплексной терапии больных острым ишемическим инсультом, улучшают клиническое течение и реабилитационный прогноз самого инсульта.

Литература

1. *Ferdinand, P. Hypoxia after stroke: a review of experimental and clinical evidence / P. Ferdinand, C. Roffe // Exp & Trans Stroke Med. – 2016. – V.8. - №9.*
2. *Roffe, C. Effect of Routine Low-Dose Oxygen Supplementation on Death and Disability in Adults With Acute Stroke: The Stroke Oxygen Study Randomized Clinical Trial / C. Roffe, T. Nevatte, J. Sim, et al. // [published correction appears in JAMA. – 2017. – V.318. -№18. – P.1831-1832]. JAMA. – 2017. – V.318. - №12. – P.1125-1135.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-112-114

INHALATION WITH THERMIC HELIOX FOR THE TREATMENT OF RESPIRATORY FAILURE SYNDROME IN ACUTE ISCHEMIC STROKE

Kim T.G., Chuchalin A.G., Gusev E.I., Martynov M.Yu., Shogenova, L.V., Panin A.A.

N.I.Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 105077, 11-ya Parkovaya str., 32, building 4, Department of Hospital Therapy of the Faculty of Pediatrics, e-mail: tnkim@mail.ru

Respiratory failure syndrome often develops due to the development of acute stroke but is not always diagnosed and treated. A new method of treating this syndrome improves the clinical course and prognosis of acute stroke.

Keywords: respiratory failure syndrome in acute ischemic stroke, hypoxemia, thermal heliox, hyperlactatemia

Respiratory failure syndrome, manifested by hypoxemia, hyperlactatemia, desaturation, episodes of nocturnal apnea, aspiration, pneumonia, often complicates acute ischemic stroke and leads to a severe clinical course and

poor rehabilitation prognosis. Hypoxemia is the leading clinical sign of respiratory failure, and its correction is of great importance for the course and outcome of the stroke itself.

Objective: to evaluate the safety and effectiveness of thermic heliox (tHe/O_2 inhalation -70-75/ 30-25 %, T-45-60°C) in comparison with inhalations with medical oxygen (FiO_2 – 40%) for the treatment of respiratory failure syndrome in patients with acute ischemic stroke.

Materials and methods: 165 patients with acute ischemic stroke were randomized into 2 groups. Group 1 patients (tHe/O_2, 91 patients, mean age 65±11.0; 54 men, 37 women) were given t-He/O_2 inhalations (70-75/30-25%, T-45-60°C, "HELIOX EXTREME", Russia) 3 times a day for 15 minutes each. Group 2 patients (O_2, oxygen, 30 patients, average age 67±12.0 years; 34 men, 30 women) received O_2 for 15 minutes 3 times a day. Neurological status, respiratory function and oxygen transport were assessed before and after inhalation of tHe/O_2 and O_2 on the 1st, 3rd, 6th, 10th and 90th days after stroke.

Results: 90 out of 91 patients in the tHe/O_2 group had a favorable functional outcome (good recovery, moderate disability) according to the NiHHS stroke severity rating scale, modified Rankin scale, and Rivermead mobility compared with patients from the group receiving oxygen therapy on the 3rd, 6th and 10th days. Initially, the NiHHS score was 7±2 in the 1st tHe/O_2 group and 8±1 in the O_2 group. On the 10th day, the NiHHS scale in the tHe/O_2 group was 3±2 points, and in the O_2 group -4± 2 points. Initially, the score on the modified Rankin scale (MRS) was 3±1 points in tHe/O_2 and 3±1 in the O_2 group. On the 10th day in the He/O_2 group, MRS was 1±1 point, in the O_2 group 2± 1 point. Initially, the Rivermead score was 7±3 in tHe/O_2 group 6+2 and 7±2 in the O_2 group. On the 10th day in the tHe/O_2 group, the score was 12±3 points, in the O_2 group-8± 3 points. Indicators of respiratory function (FVC/FEV_1, FEV_1) significantly improved in patients of tHe/O_2 group than in the O_2 group. Initially, FVC was 1.5±1 l% of due in the tHe/O_2 group, the O_2 group and 1.8±1 l% of due; on the 10th day in the tHe/O_2 group and 3.8±1 in the O_2 group and 2.8±1 l% of due. Initially, FEV1 was 250±150 ml of the due in the tHe/O_2 group, 300±150 ml of the due in the O_2 group. On the 10th day in the tHe/O_2 group 1500±200 ml of due, in the O_2 group 500±200 ml of due. FVC/FEV1 was in the tHe/O_2 group 75±10% of due, in the O_2 group 70±10% of due; on the 10th day in the tHe/O_2 group 85±10% of due, in O_2 80±10% of due. Oxygen transport parameters (PaO_2, PvO_2, pCO_2, lactate) were also significantly higher from the 1st day of treatment in the tHe/O_2 group. Initially, PaO_2 was 65±3 mmHg in the tHe/O_2 group, 67±3 mmHg in the O_2 group. On the 10th day tHe/O_2 94 ±7 mmHg, in the O_2 group 80 ±7 mmHg. Venous pO_2 was 21.2 ± 3 mmHg in the tHe/O_2 group, and 23.2±3 in the O2 group. On the 10th day of tHe/O2 33±3.6 in O2 23±3.5 mmHg of capillary blood 78.4 ± 5 mmHg in tHe/O_2, in the O_2 group 80.2±4 mmHg; on the 10th day in the 1st group 99.5±1, in the 2nd group 82±1 mmHg. Initially, arterial lactate was 3.5±2 mmHg in tHe/O_2, 3.6±2 mmHg in the O_2 group. On day 10th, in tHe/O_2 1.2±1 mm Hg, in the O_2 group-2.5 ± 1 mm Hg.

Conclusions: t-He/O_2 inhalations are an effective treatment option for respiratory failure syndrome with acute ischemic stroke, improve the clinical course and rehabilitation prognosis of the stroke itself.

References

3. *Ferdinand, P. Hypoxia after stroke: a review of experimental and clinical evidence / P. Ferdinand, C. Roffe // Exp & Trans Stroke Med. – 2016. – V.8. - №9.*

4. *Roffe, C. Effect of Routine Low-Dose Oxygen Supplementation on Death and Disability in Adults With Acute Stroke: The Stroke Oxygen Study Randomized Clinical Trial / C. Roffe, T. Nevatte, J. Sim, et al. // [published correction appears in JAMA. – 2017. – V.318. -№18. – P.1831-1832]. JAMA. – 2017. – V.318. - №12. – P.1125-1135.*

5. *Robba, C. Mechanical ventilation in patients with acute ischaemic stroke: from pathophysiology to clinical practice / C. Robba, G. Bonatti, D. Battaglini, P.R.M. Rocco, P. Pelosi // Crit Care. – 2019. – V.23. - №1. – P.388.*

6. *Rochester, C.L. Respiratory complications of stroke / C.L. Rochester, V. Mohsenin / Semin Respir Crit Care Med. – 2002. – V.23. №3. – P.248-260.*

7. *Pan, Y. The effect of heliox treatment in a rat model of focal transient cerebral ischemia / Y. Pan, H. Zhang, A.B. Acharya, S. Cruz-Flores, W.M. Panneton // Neurosci Lett. – Vol.497. – Is.2. – 2011. – P.144-147.*

8. *Pan, Y. Heliox and oxygen reduce infarct volume in a rat model of focal ischemia / Y. Pan, H. Zhang, D.R. VanDeripe, S. Cruz-Flores, W.M. Panneton / Exp. Neurol. – 2007. V.205. - №2. – P.587-590. 219. Parsons, C.G.*

УДК 577.15 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-115-116

СУПЕРКОМПЬЮТЕРНОЕ МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СЛОЖНЫХ КИНЕТИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ КАТАЛИЗА И ФАРМОКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

Лущекина С.В., Массон П., Махаева Г.Ф. Петров К.А., Григоренко Б.Л., Немухин А.В., Варфоломеев С.Д.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук. 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4, sofya.lushchekina@gmail.com

Аннотация: В докладе представляются работы по суперкомпьютерному молекулярному моделированию различных механизмов взаимодействий холинэстераз с субстратами и ингибиторами, имеющих биомедицинское значение.

Ключевые слова: молекулярное моделирование, ацетилхолинэстераза, бутурилхолинэстераза, болезнь Альцгеймера

Работы по компьютерному моделированию в области биохимии, биофизики и фармакологии холинэстераз непосредственно связаны с разработкой лекарственных препаратов для терапии болезни Альцгеймера, миастенических синдромов и отравлений нервными ядами и проводятся с использованием основных современных методов молекулярного моделирования: молекулярный докинг, молекулярная динамика, квантовая механика и комбинированный метод квантовой и молекулярной механики КМ/ММ. В докладе рассматривается весь диапазон механизмов взаимодействий холинэстераз с субстратами и ингибиторами на примере существующих и потенциальных лекарственных препаратов, природными субстратами и токсикантами: (1) исследования механизмов нековалентного ингибирования холинэстераз для разработки препаратов для паллиативной терапии болезни Альцгеймера, улучшающей когнитивные способности пациентов; (2) исследования роли ацетилхолинэстеразы в агрегации амилоидного пептида и развитии болезни Альцгеймера для разработки лекарственной терапии, замедляющей развитие нейродегенеративных процессов; (3) исследование механизмов сложной кинетики ингибирования медленного связыванию для разработки высокоэффективных препаратов для терапии миастенических синдромов со сниженными побочными эффектами; (4) исследования генетического полиморфизма холинэстераз — влияния единичных замен в гене ферментов бутирилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы на их каталитическую активность, в первую очередь, в отношении лекарственных препаратов для разработки подходов и методов персонифицированной медицины; (5) исследования механизмов реакций, протекающих в активных центрах холинэстераз: ферментативный гидролиз субстратов, ингибирование фосфорорганическими соединениями и последующие реакции старения фосфорилированного фермента и его возможной реактивации показывают возможные направления разработки т.н. «каталитических биоловушек» на основе бутирилхолинэстеразы — модификаций фермента, способных к спонтанной реактивации с достаточно высокой скоростью для защиты организма от воздействия фосфорорганических отравляющих веществ.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 19-03-00043

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-115-116

SUPERCOMPUTER MOLECULAR MODELING FOR RESEARCH ON COMPLEX CATALYC REACTIONS AND PHARMOCOLOGICAL PROBLEMS OF CHOLINESTEASES

Lushchekina S.V., Masson P., Makhaeva G.F., Petrov K.A., Grigorenko B.L., Nemukhin A.V., Varfolomeev S.D.

Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences 119334, Russia, Moscow, Kosygina st., 4, sofya.lushchekina@gmail.com

Annotation: In the present talk, works on supercomputer molecular modeling of interaction mechanisms of cholinesterases with substrates and inhibitors, related to biomedical problems are described.

Ключевые слова: molecular modeling, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, Alzheimer's disease.

Works on computer modeling in the field of biochemistry, biophysics, and pharmacology of cholinesterase are directly related to the development of new drugs for the treatment of Alzheimer's disease, myasthenic syndromes, and poisoning by nerve agents. The whole set of main modern molecular modeling methods is used: molecular docking, molecular dynamics, quantum mechanics, and combined quantum mechanics and molecular mechanics (QM/MM) methods. In the present talk, all aspects of cholinesterase interaction mechanisms with substrates and inhibitors, including current and potential drugs, natural substrates and toxicants are discussed: (1) study of reversible inhibition mechanisms of cholinesterase for development of drugs against Alzheimer's disease, improving the cognitive abilities of patients; (2) studies of the role of acetylcholinesterase in aggregation of amyloid peptide, progression of Alzheimer's disease, and for the development of new disease modifying drugs; (3) study of the complex kinetic mechanisms of slow-binding inhibition for making highly effective drugs for the treatment of myasthenic syndromes with reduced side effects; (4) studies of enzyme genetic polymorphism — effects of point mutations in the genes of butyrylcholinesterase and carboxylesterase on the catalytic activity of these enzymes against drugs to develop new approaches and methods of personalized medicine; (5) studies of the mechanisms of reactions occurring in the active sites of cholinesterases: enzymatic hydrolysis of substrates, inhibition by organophosphate compounds and subsequent “aging” reactions of phosphorylated enzyme, and its possible reactivation to show new directions for the development of butyrylcholinesterase-based catalytic bioscavengers — enzyme modifications capable of spontaneous reactivation at a rate sufficient to protect the body against the effects of organophosphorus toxicants.

The work is partly supported by RFBR grant #19-03-00043

УДК 621.039.75 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-116-117

ЗРИТЕЛЬНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ИЗМЕНЯЕТ СООТНОШЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ УЧАСТНИКОВ ГЛУТАМИН-ГЛУТАМАТНОГО ЦИКЛА В АКТИВИРОВАННОЙ КОРЕ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Манжурцев А.В.[1,2,4], **Семенова Н.А.**[1,2,3,4], **Яковлев А.Н.**[1,2,3], **Ублинский М.В.**[1,2], **Ахадов Т.А.**[1,4]

[1] *ГБУЗ НИИ Неотложной Детской Хирургии и Травматологии*
[2] *Институт Биохимической Физики им. Н.М. Эмануэля РАН*
[3] *ФИЦ Химической Физики им. Семенова РАН*
[4] *Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова*

Обнаружен достоверный рост концентраций Glu и Gln. Рост Gln характеризует активацию цикла Glu-Gln в зрительной коре при постоянной стимуляции. Рост Glu в ответ на нагрузку вероятнее всего вызван активацией его синтеза.

Ключевые слова: магнитно-резонансная спектроскопия, нейроактивация, глутамин-глутаматный цикл

Целью настоящей работы является измерение концентраций участников глутамин-глутаматного цикла. Цикл глутамат-глутамин (Glu-Gln) – это метаболическая система, функция которой – возврат глутамата в нейроны после его выделения в синаптическою щель при нервном импульсе и перехода в астроциты. Поскольку одним из фундаментальных вопросов современной нейрофизиологии является нейроваскулярное сопряжение, и кандидатом на сигнальную молекулу для запуска процессов вазодилатации и вазоконстрикции, является глутамат. Определение концентрации глутамата in vivo в условиях нагрузки открывает путь к пониманию его роли в процессе высшей нервной деятельности. Решить задачу измерения концентраций Glu и Gln in vivo возможно с помощью специальных магнитно-резонансной спектроскопии, однако, по данным стандартных спектров возможно регистрировать лишь их суммарный сигнал (Glx). Специальная методика TE averaged PRESS позволяет разделить сигналы Glu и Gln, за счёт чего становится возможным раздельно определить их концентрации. В исследовании на томографе Philips Achieva dStream 3T приняло участие 20 здоровых испытуемых. Для стимуляции использована мерцающая с частотой 8 Гц шахматная доска. Спектроскопический воксель располагался в зрительной коре. В результате исследования обнаружен достоверный рост концентраций Glu и Gln. Рост Gln характеризует активацию цикла Glu-Gln в зрительной коре при постоянной стимуляции. Рост Glu в ответ на нагрузку вероятнее всего вызван активацией его синтеза.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-116-117

VISUAL STIMULATION CHANGES THE RATIO OF CONCENTRATIONS OF PARTICIPANTS OF THE GLUTAMINE-GLUTAMATE CYCLE IN THE ACTIVATED HUMAN CEREBRAL CORTEX

Manzhurtsev A.V.[1,2,4], **Semenova N.A.**[1,2,3,4], **Yakovlev A.N.**[1,2,3], **Ublinsky M.V.**[1,2], **Akhadov T.A.**[1,4]

[1] *Clinical and Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Trauma*
[2] *Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences*
[3] *Semenov Institute of Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences*
[4] *Moscow State University*

A significant increase in the concentrations of Glu and Gln was found. Gln growth characterizes the activation of the Glu-Gln cycle in the visual cortex under constant stimulation. The increase in Glu in response to exercise is most likely caused by the activation of its synthesis.

Key words: magnetic resonance spectroscopy, neuroactivation, glutamine-glutamate cycle

The aim of this work is to measure the concentrations of participants in the glutamine-glutamate cycle. The glutamate-glutamine (Glu-Gln) cycle is a metabolic system whose function is to return glutamate to neurons after it is released into the synaptic cleft during a nerve impulse and transition to astrocytes. Since one of the fundamental questions of modern neurophysiology is neurovascular coupling, and glutamate is a candidate for a signaling molecule to trigger the processes of vasodilation and vasoconstriction. Determination of the concentration of glutamate in vivo under stress conditions opens the way to understanding its role in the process of higher nervous activity. It is possible to solve the problem of measuring the concentrations of Glu and Gln in vivo using special magnetic resonance spectroscopy, however, according to the data of standard spectra, it is possible to record only their total signal (Glx). The special TE averaged PRESS technique allows the separation of the Glu and Gln signals, due to which it becomes possible to separately determine their concentrations. 20 healthy subjects took part in the study on the Philips Achieva dStream 3T tomograph. A chessboard flickering with a frequency of 8 Hz was used for stimulation. The spectroscopic voxel was located in the visual cortex. As a result of the study, a significant increase in the concentrations of Glu and Gln was found. Gln growth characterizes the activation of the Glu-Gln cycle in the visual cortex under constant stimulation. The increase in Glu in response to exercise is most likely caused by the activation of its synthesis.

УДК 544.165 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-117-118

МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ГЛУТАМАТКАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ – УЧАСТНИКА ПОЛИФЕРМЕНТНОЙ ЦЕПИ N-АЦЕТИЛАСПАРТАТА

Немухин А.В., **Хренова М.Г.**, **Кривицкая А.В.**

Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия, 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4
Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, Москва, Россия, 119071, Москва, Ленинский просп., д. 33
e-mail: anemukhin@yahoo.com

Методами компьютерного молекулярного моделирования исследован механизм гидролиза N-ацетил-L-аспартил-L-глутамата, катализируемого глутаматкарбоксипетидазой II, до N-ацетиласпартата и глутамата.

Ключевые слова: механизм реакции; профили энергии Гиббса; молекулярная динамика КМ/ММ; активный центр; структура белка; глутаматкарбоксипетидаза

В докладе представлены результаты компьютерного исследования механизма реакции гидролиза N-ацетил-L-аспартил-L-глутамата (NAAG), катализируемого глутаматкарбокси-пептидазой II. В центре внимания работы находятся как вопросы катализа, так и аспекты электронного строения участников этой

многостадийной реакции. Модельные системы построены по мотивам подходящей кристаллической структуры мутанта фермента в неактивном состояния. После выбора координат реакции рассчитываются профили энергии Гиббса элементарных стадий реакции с использованием молекулярной динамики с потенциалами КМ/ММ неэмпирического типа. Энергии и силы в достаточно большой квантовой подсистеме оцениваются в приближении DFT(PBE0-D3/6-31G**). Установленный механизм включает четыре элементарных стадии с энергетическими барьерами активации не более 7 ккал/моль. Модели объясняют роль точечных мутаций в ферменте, наблюдаемых в экспериментальных кинетических исследованиях; а именно, замена Tyr552Ile разрушает оксианионный центр, а замена Glu424Gln увеличивает расстояние нуклеофильной атаки. Оба фактора уменьшают активацию субстрата в активном центре фермента. Для количественной оценки активации субстрата мы применяем подходы на основе количественной теории атомов в молекулах (QTAIM) и анализ динамических характеристик соответствующих фермент-субстратных комплексов с помощью теории натуральных орбиталей связи (NBO). Анализ двумерного лапласиана карт электронной плотности позволяет определить структуры с деконцентрацией электронной плотности на атоме углерода подложки, т.е. в электрофильном центре реагентов. Аналогичным элементом электронной структуры в подходе NBO является неподеленная вакансия на карбонильном атоме углерода в реакционных частицах. Работы поддержаны грантом Российского научного фонда (проект 18-13-00030).

UDK 544.165 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-117-118

MODELING REACTION MECHANISM OF GLUTAMATE CARBOXYPEPTIDASE – A MEMBER OF THE POLYENZYME CHAIN OF N-ACETYLASPARTATE

Nemukhin A.V., Khrenova M.G., Krivitskaya A.V.

N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, 119334 Moscow, Kosygina, 4
A.N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, 119071 Moscow, Leninsky prosp., 33
e-mail: anemukhin@yahoo.com

Computational methods of molecular modeling are used to simulate the reaction mechanism of hydrolysis of N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate catalyzed by glutamate carboxypeptidase II to N-acetylaspartate and glutamate.

Keywords: reaction mechanism; Gibbs energy profiles; QM/MM molecular dynamics; active site; protein structure; glutamate carboxypeptidase

We report the results of computational study of the hydrolysis reaction mechanism of N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate (NAAG) catalyzed by glutamate carboxypeptidase II. Analysis of both mechanistic and electronic structure aspects of this multistep reaction is in the focus of this work. In these simulations, model systems are constructed by motifs of the relevant crystal structure of the mutated inactive enzyme. After selection of reaction coordinates, the Gibbs energy profiles of elementary steps of the reaction are computed using molecular dynamics simulations with ab initio type QM/MM potentials (QM/MM MD). Energies and forces in the fairly large QM subsystem are estimated in the DFT(PBE0-D3/6-31G**) approximation. The established mechanism includes four elementary steps with the activation energy barriers not exceeding 7 kcal/mol. The models explain the role of point mutations in the enzyme observed in the experimental kinetic studies; namely, the Tyr552Ile substitution disturbs the “oxyanion hole”, and the Glu424Gln replacement increases the distance of the nucleophilic attack. Both issues diminish the substrate activation in the enzyme active site. To quantify the substrate activation, we apply the QTAIM-based approaches and the NBO analysis of dynamic features of the corresponding enzyme-substrate complexes. Analysis of the 2D Laplacian of electron density maps allows one to define structures with the electron density deconcentration on the substrate carbon atom, i.e., at the electrophilic site of reactants. The similar electronic structure element in the NBO approach is a lone vacancy on the carbonyl carbon atom in the reactive species. The electronic structure patterns revealed in the NBO and QTAIM-based analyses consistently clarify the reactivity issues in this system. The study is supported by the Russian Science Foundation (project 18-13-00030).

УДК 544.42+577.322 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-119-121

ВЛИЯНИЕ ТЕРМОГЕЛИОКСА НА ПРОТЕОМНЫЙ СОСТАВ КОНДЕНСАТА ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА

Рябоконь А.М., Шогенова Л.В., Кононихин А.С., Козырь А.С., Панин А.А., Варфоломеев С.Д., Чучалин А.Г.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия
119334 Москва, ул. Косыгина, 4.
E-mail: amryabokon@gmail.

Проведен масс-спектрометрический анализ протеома конденсата выдыхаемого воздуха до и сразу после процедуры термогелиокса, а также после релаксации в течение 3 ч. При этом основная часть протеома оставалась неизменной и не наблюдалось обвального разрушения клеток.

Ключевые слова: термогелиокс, терапия, конденсат выдыхаемого воздуха, протеом, масс-спектрометрический анализ.

Высокотемпературную дыхательную смесь гелия и кислорода (термогелиокс) начали активно применять для лечения разнообразных заболеваний, в частности, хронической обструктивной болезни легких, ишемического инсульта, некоторых патологий беременностии т.д. Вместе с тем влияние термогелиокса на организм человека представляется сложным и требует дополнительного изучения.

Мы исследовали вопрос о деструктивном влиянии термогелиокса на легочную ткань путем оценки состава белков в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) человека до и после дыхательной процедуры, проводимой в течение 20 мин. Температура ингаляции на входе в дыхательную систему 70°С. Для сравнения проведено также исследование состава белков в КВВ после релаксации в течение 3 ч.

Сбор КВВ и дальнейший анализ белкового состава КВВ проводились в соответствии с ранее опубликованными протоколами [1, 2].

При сравнении трех групп белков (до процедуры, сразу после и через 3 часа релаксации) мы наблюдали общую картину, которая присутствует во всех пробах КВВ, отбираемых у здоровых пациентов [3]. Это — несколько белков иммуноглобулинового ряда, несколько структурных белков кератиновой природы, тубулин, кальмодулин. Общая типичная картина наблюдается для проб до термогелиоксной процедуры, сразу после нее, а также после релаксации в течение 3 ч. Следует отметить, что в КВВ устойчиво проявляются белки иммунной системы (иммуноглобулины, белки комплимента). Такие же белки обнаруживаются в КВВ после термогелиокса и после релаксации в течение 3 ч. Как известно, иммуноглобулины, прежде всего иммуноглобулин А, хорошо представлены в слизистой оболочке. Это, по-видимому, является причиной их появления в КВВ.

В пробах после термогелиокса наблюдается появление в небольших количествах дополнительных белков. Это — белки мышечного метаболизма (актины и кальмодулины), фибриноген, следы гемоглобина, аполипопротеина и креатинкиназы В-типа. После релаксации в течение 3 ч в КВВ исчезает тубулин.

Проведенные эксперименты демонстрируют тот факт, что значительного разрушения клеток с переносом в выдыхаемый воздух большого количества белков не наблюдается. При заметном разрушении клеток в КВВ должны были бы появляться сотни внутриклеточных белков, осуществляющих весь спектр метаболизма. Большая часть выдыхаемых белков одинакова до и после процедуры термогелиокса, а также после релаксации в течение 3 ч.

Полученные результаты демонстрируют относительную безопасность применения высокотемпературного термогелиокса как терапевтического средства.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-2909158МК).

Литература

1. *А. М. Рябоконь, Э. Х. Анаев, А. С. Кононихин, Н. Л. Стародубцева, Г. Х. Киреева, И. А. Попов, Е. Н. Кукаев, В. В. Бармин, В. А. Багров, О. В. Пикин, Е. Н. Николаев, С. Д. Варфоломеев. Сравнительный протеомный анализ конденсата выдыхаемого воздуха у пациентов с раком легкого методом масс-спектрометрии высокого разрешения // Пульмонология. – 2014. - № 1. – С. 5—11.*

2. *А. С. Кононихин, Н. В. Захарова, А. Э. Юсупов, А. М. Рябоконь, К. Ю. Федорченко, М. И. Индейкина, А. Е. Бугрова, А. И. Спасский, И. А. Попов, С. Д. Варфоломеев, Е. Н. Николаев. Исследование молекулярного состава конденсата выдыхаемого воздуха методом масс-спектрометрии высокого разрешения // Хим. физика. – 2019. - № 12. – С. 59—63*

3. В. С. Курова, А. М. Рябоконь, Э. Х. Анаев, А. Г. Чучалин, А. С. Кононихин, И. А. Попов, Е. Н. Николаев, С. Д. Варфоломеев. Протеомика конденсата моделирования выдыхаемого воздуха человека. Новая платформа для биомедицинской диагностики // в сб. Пост-геномные исследования и техно¬логии, МАКС Пресс, Москва, 2011, с. 174—202.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-119-121

THERMOHELIOX INFLUENCE ON THE PROTEOMIC COMPOSITION OF EXHALED BREATH CONDENSATE

Ryabokon A.M., Shogenova L.V., Kononikhin A.S., Kozyr A.S., Panin A.A., Varfolomeev S.D., Chuchalin A.G.

N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
4 ul. Kosygina, 119334, Moscow, Russian Federation
E-mail: amryabokon@gmail.com

The proteome of exhaled breath condensate was analyzed by mass spectrometry before, immediately after the thermoheliox procedure and after a 3 h relaxation. The major part of the proteome remained unchanged and there was no extensive cell destruction

Key words: thermoheliox, therapy, exhaled breath condensate, proteome, mass spectrometric analysis.

The high-temperature breathing mixture of helium and oxygen (thermoheliox) started to be actively used for the treatment of various diseases, in particular, chronic obstructive pulmonary disease, ischemic stroke, and some pathologies of pregnancy etc. At the same time, the effect of thermogeliox on the human body seems to be complex and requires additional study.

We investigated the question of the destructive effect of thermogeliox on lung tissue by assessing the composition of proteins in the exhaled breath condensate (EBC) of a person before and after the respiratory procedure carried out for 20 minutes. The mixture temperature at the inlet of the respiratory tract was 70 °C. The protein composition of the EBC after relaxation for 3 h was also studied for comparison.

Collection of EBC and further analysis of the protein composition of EBC were carried out in accordance with previously published protocols [1, 2].

When comparing three groups of proteins (before the procedure, immediately after and 3 hours after of relaxation), we observed a general picture that is present in all EBC samples taken from healthy patients [3]. They include several immunoglobulin proteins, several keratin structural proteins, tubulin, and calmodulin. The general typical pattern observed for samples before the thermoheliox procedure, immediately after the procedure, and after the relaxation for 3 h. It is noteworthy that the immune system proteins (immunoglobulins, complement proteins) are always detected in EBC. The same proteins are found in EBC after thermoheliox procedure and after relaxation for 3 h. It is known that immunoglobulins, first of all immunoglobulin A, are well presented in the mucous membrane. This is apparently responsible for their appearance in EBC.

The samples after the thermoheliox procedure contain small amounts of additional proteins. These are muscle metabolism proteins (actins and calmodulin), fibrinogen, and traces of hemoglobin, apolipoprotein, and creatine kinase B type. After the relaxation for 3 h, tubulin is no longer detected in the EBC.

Significant destruction of cells with the transfer of large amounts of proteins to the exhaled breath does not takes place, according to the conducted experiments. A significant destruction of cells would give rise to hundreds of intracellular proteins, performing the whole range of metabolism, in the EBC. The numbers of exhaled proteins are mainly equal before and after the thermoheliox procedure and also after relaxation for 3 h.

The results demonstrate relative safety of the use of hightemperature thermoheliox as a therapeutic agent.

This work was financially supported by the Russian Foundation of Basic Research (Project No. 18-2909158 MK).

References

1. A. M. Ryabokon, E. Kh. Anaev, A. S. Kononikhin, N. L. Starodubtseva, G. Kh. Kireeva, I. A. Popov, E. N. Kukaev, V. V. Barmin, V. A. Bagrov, O. V. Pikin, E. N. Nikolaev, S. D. Varfolomeev. Comparative proteomic analysis of exhaled breath condensate in patients with lung carcinoma using high resolution mass-spectrometry // Pul'monologiya [Pulmonology], 2014, 1, 5—11 (in Russian).

2. A. S. Kononikhin, N. V. Zakharova, A. E. Iusupov, A. M Ryabokon, K. Yu. Fedorchenko, M. I. Indeykina, A. E. Bugrova,

A. I. Spassky, I. A. Popov, S. D. Varfolomeev, E. N. Nikolaev. Study of the Molecular Composition of Exhaled Breath Condensate by High-Resolution Mass Spectrometry // Russ. J. Phys. Chem. B (Engl. Transl.), 2019, 13, 951—955.

3. *V. S. Kurova, A. M. Ryabokon´, E. Kh. Anaev, A. G. Chuchalin, A. S. Kononikhin, I. A. Popov, E. N. Nikolaev, S. D. Varfolomeev. Proteomics of condensate modeling of human exhaled air. New platform for biomedical diagnostics // in: Post-genomnye Issledovaniya I Tekhnologii [Post-genomic Studies and Technologies], MAKS Press, Moscow, 2011, p. 174—202.*

УДК 57.087.1 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-121-122

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА PGH-СИНТАЗЫ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ BOLD-СИГНАЛА В ЗРИТЕЛЬНОЙ КОРЕ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВИДЕОСТИМУЛЯЦИИ ПО ДАННЫМ ФМРТ ИССЛЕДОВАНИЯ

М.В. Ублинский[1,2*], **Н.А. Семенова**[1,2,3], **А.В. Манжурцев**[1,2,3], **А.Н. Яковлев**[1,2,3], **Т.А. Ахадов**[2,3], **С.Д. Варфоломеев**[1,3]

[1] *Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии Наук, Российская Федерация, Москва, 119334, ул. Косыгина, д. 4, ibcp@sky.chph.ras.ru*
[2] *НИИ Неотложной детской хирургии и травматологии ДЗ г. Москвы, Российская Федерация, Москва, 119180, ул. Большая Полянка, 22, niindht@zdrav.mos.ru*
[3] *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Российская Федерация, Москва, 119991, ул. Колмогорова, 1, mgu@univer.msu.ru*

Обнаружено, что повторное возбуждение и использование аспирина как ингибитора синтеза простагландинов не влияет на уровень BOLD-сигнала в зрительной коре. Обнаружено снижение гемодинамического ответа на зрительную стимуляцию в области таламуса под действием аспирина.

Ключевые слова: ацетилсалициловая кислота, PGH-синтаза, функциональная МРТ, BOLD ответ, нейроактивация, таламус

В астроцитах при нейроактивации под действием PGH-синтазы синтезируются простогландины - производные арахидоновой кислоты (AA) - способные регулировать локальный кровоток. Единственным необратимым ингибитором PGH-синтазы является ацетилсалициловая кислота (аспирин). Однако, известно, что аспирин имеет два противоположных эффекта: ингибируя PGH-синтазу, препятствует расширению сосудов, активируя синтез оксида азота (NO) в клетках эндотелия, вызывает расширение сосудов. Вклад каждого из этих эффектов в механизм действия аспирина до настоящего времени не оценён. Для анализа данных эффектов мы исследовали влияние аспирина на интенсивность BOLD-сигнала в мозге человека при зрительной стимуляции.

Проведённое экспериментальное исследование позволило обнаружить три важных эффекта: 1) выявлены церебральные локусы, в которых контраст статистически достоверно снижается при повторном фМРТ-исследовании; 2) обнаружено, что повторное возбуждение и использование аспирина как ингибитора синтеза простагландинов не влияет на уровень BOLD-сигнала в зрительной коре; 3) обнаружено снижение гемодинамического ответа на зрительную стимуляцию в области таламуса под действием аспирина.

Полученные результаты свидетельствуют о разном соотношении активностей инициированных препаратом процессов вазодилатации и вазоконстрикции. Более низкое содержание фермента - предшественника PGH-синтазы - может быть причиной меньшего эффекта её ингибирования аспирином в зрительной коре по сравнению с таламусом. Это создает статистически достоверный вазоконстрикторный эффект препарата в таламусе при видеостимуляции.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-121-122

THE EFFECT OF ACETYLSALICYLIC ACID ON INTENSTITY OF BOLD SIGNAL IN HUMAN VISUAL CORTEX DURING VIDEO STIMULATION. FMRI STUDY

M.V. Ublinskiy[1,2], **N.A. Semenova**[1,2,3], **A.V. Manzhurtsev**[1,2,3], **A.N. Yakovlev**[1,2,3], **T.A. Akhadov**[2,3], **S.D. Varfolomeev**[1,3]

1 Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences,
Russian Federation, Moscow, 119334, Kosygina, 4, ibcp@sky.chph.ras.ru
2 Clinical and Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Trauma,
Russian Federation, Moscow, 119180, Bolshaya Polyanka, 22, niindht@zdrav.mos.ru
3 Lomonosov Moscow State University,
Russian Federation, Moscow, 119991, Kolmogorova, 1, mgu@univer.msu.ru

It was found that repeated excitation and the use of aspirin as an inhibitor of prostaglandin synthesis did not affect level of BOLD signal in visual cortex. It was found a decrease in hemodynamic response to visual stimulation in thalamus under the influence of aspirin.

Keywords: acetylsalicylic acid, PGH-synthase, functional MRI, BOLD response, neuroactivation, thalamus

In astrocytes, during neuroactivation under the action of PGH synthase, prostaglandins (derivatives of arachidonic acid (AA) which are capable of regulating local blood flow) are synthesized. The only irreversible inhibitor of PGH synthase is acetylsalicylic acid (aspirin). However, it is known that aspirin has two opposite effects: 1) inhibiting PGH synthase and prevents vasodilatation; 2) activating the synthesis of nitric oxide (NO) in endothelial cells, and causes vasodilation. The contribution of each of these effects to mechanism of aspirin action has so far been invaluable. To assess these effects, we studied the effect of aspirin on the intensity of BOLD signal in human brain upon visual stimulation.

Performed experimental study revealed three important effects: 1) revealed cerebral loci in which BOLD-contrast is statistically significantly reduced upon repeated fMRI examination; 2) it was found that repeated excitation and the use of aspirin as an inhibitor of prostaglandin synthesis did not affect level of BOLD signal in visual cortex; 3) found a decrease in hemodynamic response to visual stimulation in thalamus under the influence of aspirin.

Obtained results indicate a different ratio of the activities of drug-initiated processes of vasodilation and vasoconstriction. Lower content of the enzyme, precursor of PGH synthase, may be the reason for lesser effect of its inhibition by aspirin in visual cortex compared to thalamus. This creates a statistically significant vasoconstrictor effect of the drug in thalamus during video stimulation.

УДК 577.151.4 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-122-123

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ФОСФОТРИЭСТЕРАЗ, ГИДРОЛИЗУЮЩИХ ОРГАНОФОСФАТЫ С ИНАКТИВИРОВАННОЙ УХОДЯЩЕЙ ГРУППОЙ

Мулашкина Т.И., Кулакова А.М., Хренова М.Г.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1
e-mail: mkhrenova@lcc.chem.msu.ru

Определен механизм гидролиза органофосфатов дибутил-4-нитро-фенилфосфата и его аналога с инактивированной уходящей группой – дибутилфенилфосфата, фосфотриэстеразой Pd-PTE.

Ключевые слова: органофосфаты; КМ/ММ молекулярная динамика; механизмы ферментативных реакций.

В докладе будут обсуждаться результаты молекулярного моделирования, объясняющие молекулярный механизм наблюдаемой субстратной специфичности фосфотриэстеразы Pd-PTE. Прикладная значимость данной работы связана с тем, что огнезащитные средства содержат галогенированные алкильные и ароматические эфиры и, несмотря на кажущуюся химическую инертность, являются канцерогенами. В отличие от хорошо изученных боевых отравляющих веществ и инсектицидов, они представляют собой органофосфаты с инактивированной уходящей группой. Одним из существующих способов ликвидации этих

загрязнений является их гидролиз бактериальными ферментами – фосфотриэстеразами. При этом большинство известных фосфотриэстераз не способны их гидролизовать. Будет показано, чем отличаются энергетические профили реакции гидролиза дибутил-4-нитро-фенилфосфата и его аналога с инактивированной уходящей группой – дибутилфенилфосфата в активном центре Pd-PTE, а также будет представлен детальный анализ динамического поведения интермедиатов этих реакций. Расчеты проведены методом молекулярной динамики с потенциалами комбинированного метода квантовой механики / молекулярной механики. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 21-33-70001).

UDC 577.151.4 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-122-123

STRUCTURAL FEATURES OF PHOSPHOTRIESTERASES HYDROLYZING ORGANOPHOSPHATES WITH AN INACTIVATED LEAVING GROUP

Mulashkina T.I., Kulakova A.M., Khrenova M.G.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119991, Moscow, Leninskie Gory, bld. 1
e-mail: mkhrenova@lcc.chem.msu.ru

The mechanism of hydrolysis of organophosphates, dibutyl-4-nitro-phenylphosphate and its analogue with an inactivated leaving group – dibutylphenylphosphate by phosphotriesterase Pd-PTE has been determined.

Keywords: organophosphates; QM/MM molecular dynamics; enzymatic reaction mechanisms.

We report results of molecular modeling explaining the molecular mechanism of the observed substrate specificity of Pd-PTE phosphotriesterase. The significance of this work is related to the fact that flame retardants contain halogenated alkyl and aromatic esters and, despite their apparent chemical inertia, are carcinogens. Unlike well-studied chemical warfare agents and insecticides, they are organophosphates with an inactivated outgoing group. One of the existing ways to eliminate these contaminants is their hydrolysis by bacterial enzymes - phosphotriesterases. At the same time, most of the known phosphotriesterases are not able to hydrolyze them. It will be shown how the energy profiles of the hydrolysis reaction of dibutyl-4-nitro-phenylphosphate and its analogue with an inactivated outgoing group – dibutylphenylphosphate in the Pd-PTE active center differ, and a detailed analysis of the dynamic behavior of the intermediates of these reactions will be presented. The calculations were carried out using molecular dynamics with potentials of the combined method of quantum mechanics / molecular mechanics. The work was carried out with the financial support of the RFBR (project # 21-33-70001).

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-123-124

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ МЕДИЦИНСКИМИ ГАЗАМИ И РЕСПИРАТОРНОЙ ПОДДЕРЖКОЙ У ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРКАПНИЧЕСКОЙ ДЫХАТЕЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ПРИ ОБОСТРЕНИИ ХОБЛ

Т.Т. Чыонг., Шогенова Л.В., Селимир Д.С., Панин А.А., Чучалин А.Г.

Российский национальный исследовательский университет имени Н.И.Пирогова.
Россия, г. Москва. ул. Островитянова, д. 1
РФЯЦ-ВНИИЭФ (предприятие Госкорпорации «Росатом»)
ООО «МЕДТЕХИНОВАЦИИ», г. Москва. Россия. e-mail: Luda_Shog@list.ru

ХОБЛ является одной из ведущих причин заболеваемости и смертности в РФ. Распространенность достигает 6–10 % от общей популяции. Тяжелые и частые обострения ХОБЛ приводят к острой гиперкапнической ДН, требующей проведения НИВЛ. У 30 % больных с тяжелым обострением ХОБЛ, НИВЛ не приводит к желаемым результатам. Для оптимизации проведения НИВЛ у этой группы больных мы применили ингаляции термического гелиокса (t-He/O_2) и оксида азота (iNO), что существенно улучшило транспорт O_2, элиминацию CO_2, гемодинамику и стабилизировало уровень лактата.

Ключевые слова: ХОБЛ, термический гелиокс, оксид азота, НИВЛ.

Результаты: Динамика в 1-ой группе: pH с 7.28±0.15 до 7.32±0.0 (p<0,01), PaO_2 с 65±6.0 до 78.5±5.72 мм рт.ст (p<0,01); $PaCO_2$ с 72±4.1 до 47.1±3.3 мм рт.ст (p<0,05); SaO_2 с 84.6±2.3 до 92.5±1.2 мм рт.ст (p<0,05); HCO_3- с 34.68±2.5 до 25.5±2.3 ммоль/л (p<0.05); лактат с 2.06±0.7 до 1.10±0.4 (p<0.05); Qs/Qt с 28.24±5.07 до 5.34±3.2 % p<0.05; PPAs с 85±10,1 до 65±12.7 мм рт.ст (p<0,05); SI с 8.8±1.8м/с до 6.8±1.5 м/с (p<0.0001). Во 2-й группе: pH с 7.28±0.12 до 7.30±0.0,1; PaO_2 с 65.2±7.1 до 71.4±4.2 мм рт ст (p<0,01); $PaCO_2$ с 71.8±3.2 до 58.5±2.5 мм рт.ст (p<0,05); SaO_2 с 83.6±2.3 до 89.1±1.3% (p<0,01); HCO_3- с 35.12±1.5 до 28.4±2.2 ммоль/л (p<0.01); лактат с 2.07±0.3 до 0.80±0.2 ммоль/л (p<0,01); Qs/Qt 27.14±5.5% до 10.32±1.3% (p<0.05); PPAs с 85±10,1 до 65±12.7 мм рт.ст (p<0,05); SI с 8.19±2.0 м/с до 8.5±2.0 м/с (p<0,01). Заключение: Комбинированная терапия t-He/O_2, iNO и НИВЛ позволяет существенно улучшить транспорт кислорода, элиминацию CO_2, стабилизировать уровень лактата, улучшить гемодинамику.

Литература

1. *Helium oxygen mixtures in the intensive care unit, Chevrolet JC., Crit Care. 2001 Aug;5(4):179-81. Epub 2001 Jul 13. Review.*
2. *Чучалин А.Г. Роль оксида азота в современной клинической практике: научный доклад на V Всероссийском конгрессе «Легочная гипертензия». Журнал пульмонология. Том 28, № 4 (2018).*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-123-124

COMBINED THERAPY WITH MEDICAL GASES AND RESPIRATORY SUPPORT IN PATIENTS WITH HYPERCAPNIC RESPIRATORY FAILURE WITH EXACERBATION OF COPD

T.T. Truong, Shogenova L.V., Selimir D.S., Panin A.A., Chuchalin A.G.

Pirogov Russian National Research Medical University, Department of hospital therapy of pediatric faculty, 1, Ostrovetyanova street, City of Moscow, Russia
RFNC-VNIIEF (ROSATOM State Corporation enterprise)
"MEDTECHNOVATSII", Moscow. Russia. e-mail: Luda_Shog@list.ru

COPD is one of the leading causes of morbidity and mortality in the Russian Federation. The prevalence reaches 6-10% of the general population. Severe and frequent exacerbations of COPD lead to acute hypercapnic DN requiring NIV. In 30% of patients with severe exacerbation of COPD, NIV does not lead to the desired results. To optimize NIV in this group of patients, we used inhalations of thermal heliox (t-He/O2) and nitric oxide (iNO), which significantly improved O2 transport, CO2 elimination, hemodynamics and stabilized lactate levels.

Keywords: COPD, thermal heliox, nitric oxide, NIVL.

Results: Dynamics in the 1st group: pH of 7.28±0.15 to 7.32±0.0 (p<0,01), PaO_2 of 65±6.0 to 78.5±5.72 mmHg (p<0,01); $PaCO_2$ of 72±4.1 to 47.1±3.3 mmHg (p<0,05); SaO_2 of 84.6±2.3 to 92.5±1.2 mmHg (p<0,05); HCO_3- to 34.68±2.5 to 25.5±2.3 mmol/l (p<0.05); лактат of 2.06±0.7 to 1.10±0.4 (p<0.05); Qs/Qt of 28.24±5.07 to 5.34±3.2 % (p<0.05); PPAs of 85±10,1 to 65±12.7 mmHg (p<0,05); SI of 8.8±1.8 m/s to 6.8±1.5 m/s (p<0.0001). Во 2-й группе: pH of 7.28±0.12 to 7.30±0.0,1; PaO_2 of 65.2±7.1 to 71.4±4.2 mmHg (p<0,01); $PaCO_2$ of 71.8±3.2 to 58.5±2.5 mmHg (p<0,05); SaO_2 of 83.6±2.3 to 89.1±1.3% (p<0,01); HCO_3- of 35.12±1.5 to 28.4±2.2 mmol/l (p<0.01); лактат of 2.07±0.3 to 0.80±0.2 mmol/l (p<0,01); Qs/Qt of 27.14±5.5% to 10.32±1.35% (p<0.05); PPAs of 85±10,1 to 65±12.7 mmHg (p<0,05); SI of 8.19±2.0 м/с to 8.5±2.0 m/s (p<0,01).

Conclusion: The combined therapy of t-He/O2, no and ventilator can significantly improve oxygen transport, CO_2 elimination, stabilize lactate levels, and improve hemodynamics.

References

1. *Helium oxygen mixtures in the intensive care unit, Chevrolet JC., Crit Care. 2001 Aug;5(4):179-81. Epub 2001 Jul 13. Review*
2. *Chuchalin A.G. The role of nitric oxide in modern clinical practice: scientific report at the V All-Russian Congress "Pulmonary Hypertension". Journal of Pulmonology. Volume 28, No. 4 (2018).*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-125-126

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МАГНИТНО- РЕЗОНАНСНАЯ ТОМОГРАФИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ ВЛИЯНИЯ ТЕРМОГЕЛИОКСА НА ГЕМОДИНАМИКУ ВОЗБУЖДЕНОЙ ЗРИТЕЛЬНЫМ СИГНАЛОМ ЗОНЫ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

А.Н. Яковлев[1,2,3], Н.А. Семенова[1,2,3,4], М.В. Ублинский[1,3], Т.А. Ахадов[1,4], В.И. Быков[3], А.А.Панин, С.Б. Цыбенова[3], С. Д. Варфоломеев[3,4,5]

[1] НИИ неотложной детской хирургии и травматологии, Москва, Россия
[2] Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия
[3] Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия
[4] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Институт физико-химических основ функционирования сети нейронов и искусственного интеллекта, Москва, Россия
[5] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия
email: yakovlevalekcej@bk.ru

При помощи функциональной магнитно-резонансной томографии показано, что в результате ингаляции термогелиоксом изменяется временная зависимость BOLD-ответа на зрительный стимул. Полученное изменение длительности гемодинамического ответа означает замедление процесса вазоконстрикции сосудов в зоне возбуждения.

Ключевые слова: BOLD-эффект; термогелиокс

Проведен анализ полученных методом функциональной магнитно-резонансной томографии до и после получасовой ингаляции термогелиоксом (21% кислорода, 79% гелия, температура 70ºС) временных зависимостей интенсивности BOLD – сигнала в зоне зрительной коры мозга человека, возбужденной 3^x с зрительным стимулом (изображение шахматной доски, мигающей с частотой 4 Гц).

Установлено, что после периода индукции (~2 с) наблюдается основной гемодинамический всплеск (максимум на 6 секунде) с последующим спадом и вторичным слабым ответом (максимум на 15–18 с). Полученные кинетические кривые проанализированы при помощи функции:

$f(t) = 1 + At^n \cdot \exp(-kt)$.

в которой вазодилаторный эффект описывается функцией At^n, а вазоконстрикторный - $\exp(-kt)$ ($f(t)$ – BOLD-эффект, оцененный экспериментальными данными). В результате сравнения параметра k до и после ингаляции оказалось, что данный параметр ниже после ингаляции термогелиоксом в стадии спада BOLD. Это означает, что термогелиокс замедляет процесс вазоконстрикции (релаксации) индуцированного нервным импульсом расширения сосудов в зоне возбуждения и пролонгирует тем самым гемодинамический импульс.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-125-126

FUNCTIONAL MAGNETIC RESONANCE TOMOGRAPHY IN STUDYING THE INFLUENCE OF THERMOHELIOX ON HEMODYNAMICS OF THE HUMAN CEREBRAL CORTEX EXCITED BY THE VISUAL STIMULUS.

A. Yakovlev[1,2,3], N. Semenova[1,2,3,4], M. Ublinskiy[1,3], T. Akhadov[1,4], V. Bykov[3], A. Panin, S. Tsybenova[3], S. Varfolomeev[3,4,5]

[1] Clinical and Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Trauma, Moscow
[2] N.N.Semenov Federal research center of Chemical Physics Russian Academy of Sciences, Moscow
[3] N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia
[4] Lomonosov Moscow State University, Institute of Physical and Chemical Grounds of Neuronet Functions and Artificial Intelligence, Moscow, Russia;

[5] *Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, Russia*
email: yakovlevalekcej@bk.ru

Using functional magnetic resonance imaging, it was shown that inhalation with thermogeliox changes the time dependence of the BOLD response to a visual stimulus. The resulting change in the duration of hemodynamic response caused by slowing down of the process of vasoconstriction of vessels in excitement.

Key words: BOLD effect; thermogeliox

The analysis of the time dependences of the intensity of the BOLD signal in the area of the visual cortex of the human brain excited by 3 seconds long visual stimulus (image of a checkerboard flickering at 4 Hz). It was found that after the induction period (~2 s), a main hemodynamic surge (maximum at 6 seconds) is observed, followed by a decline and a secondary weak response (maximum at 15-18 seconds). The resulting kinetic curves are analyzed using the function:

$f(t) = 1 + At^n \cdot \exp(-kt)$.

in which the vasodilatory effect is described by the function At^n, and the vasoconstrictor effect is described by exp(–kt) (f (t) is the BOLD effect estimated by experimental data). As a result of comparing the parameter k before and after inhalation, it turned out that this parameter is lower after inhalation with Thermogeliox in the BOLD decay stage. This means that thermogeliox slows down the process of vasoconstriction (relaxation) of the vasoconstriction induced by a nerve impulse in the excitation zone and thereby prolongs the hemodynamic impulse.

ЦИФРОВОЙ БИОДИЗАЙН И ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЕ

DIGITAL BIODESIGN AND PERSONALISED HEALTHCARE

1. ОТРАЖАЕТ ЛИ ПРОТЕОМНОЕ «ЗЕРКАЛО» КЛИНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОЖИРЕНИЯ?
Киселева О.И., Арзуманян В.А., Поверенная Е.В., Пятницкий М.А., Ильгисонис Е.В., Згода В.Г., Плотников О.А., Шарафетдинов К.К., Лисица А.В., Тутельян В.А, Никитюк Д.Б., Арчаков А.И., Пономаренко Е.А. 129

DOES PROTEOMIC MIRROR REFLECT CLINICAL CHARACTERISTICS OF OBESITY?
Kiseleva O.I., Arzumanian V.A., Poverennaya E.V., Pyatnitskiy M.A., Ilgisonis E.V., Zgoda V.G., Plotnikov O.A., Sharafetdinov, Lisitsa A.V., Tutelyan V.A., Nikityuk D.B., Archakov A.I., Ponomarenko E.A. 130

2. «ВИТРИНА» БИООБРАЗЦОВ: СПОСОБ КОММУНИКАЦИИ МЕЖДУ ИССЛЕДОВАТЕЛЕМ И ДЕРЖАТЕЛЕМ БИОБАНКА
Букреева А.С. 130

«SHOWCASE» OF BIOSPECIMEN: METHOD OF COMMUNICATION BETWEEN RESEARCHER AND BIOBANK HOLDER
Bukreeva A.S. 131

3. ВЫЧИСЛИТЕЛЬНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ СТЕНОЗОВ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА
Василевский Ю.В., Гамилов Т.М., Симаков С.С., Копылов Г.В., Копытов Ф.Ю., Гогниева Д.Г. 132

COMPUTATIONAL TECHNOLOGY FOR NON-INVASIVE DIAGNOSIS OF CORONARY ARTERY STENOSIS IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE
Vassilevski Y.V., Gamilov T.M., Simakov S.S., Kopytov G.V., Kopylov P.Y., Gognieva D.G. 133

4. ЦИФРОВОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ IN VITRO ИССЛЕДОВАНИЙ
Ефремов Ю. М., Ермолаева А.В., Владимиров Г.К., Гордлеева С.Ю., Заикин А.А., Тимашев П.С. 134

DIGITAL MODELING of IN VITRO RESEARCH
Efremov Yu.M., Ermolaeva A.V., Vladimirov G.K., Gordleeva S.Yu., Zaikin A.A., Timashev P.S. 135

5. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ОБУЧАЕМЫЕ СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО КОНТРОЛЯ КИСЛОРОДНОГО СТАТУСА ТКАНЕЙ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА
А.Ю.Зайцева, М.С.Мазинг, С.А.Авдюшенко 137

DIAGNOSTIC TRAINING SENSOR SYSTEMS FOR PERSONALIZED CONTROL OF OXYGEN STATUS OF HUMAN TISSUE TISSUE
A.Yu.Zaitceva, M.S. Mazing, S.A. Avdyushenko 138

6. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПРОФИЛЬ ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА - СОВРЕМЕННЫЕ ТРЕНДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.
Ильгисонис Е.В., Тарбеева С.Е., Лисица А.В, Пономаренко Е.А. 139

6. MOLECULAR PROFILE OF A HEALTHY PERSON - MODERN RESEARCH TRENDS.
Ilgisonis E.V., Tarbeeva S.E., Lisitsa A.V., Ponomarenko E.A. 140

7. НЕЙРОННАЯ СЕТЬ ДЛЯ КЛАССИФИКАЦИИ НЕОТНЕСЁННЫХ MACC-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ ДАННЫХ В ПРОТЕОМЕТАБОЛОМИКЕ
Кайшева А.Л., Петровский Д.В. 141

NEURAL NETWORK AS AN APPROACH TO THE CLASSIFICATION OF UNASSIGNED LC-MS DATA IN PROTEOMETABOLOMICS
Kaysheva A.L., Petrovsky D.V. 141

8. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ РАКА
Киямова Р.Г., Скрипова В.С., Булатова Л.Ф., Савенкова Д.С, Нургалиева А.К.,
Власенкова Р.А., Решетникова Д.Д., Тимонина А.А., Богданов М.В. 142

MOLECULAR MARKERS FOR CANCER DIAGNOSIS AND THERAPY
Kiyamova R.G., Skripova V.S., Bulatova L.F., Savenkova D.S., Nurgalieva A.K.,
Vlasenkova R.A., Reshetnikova D.D., Timonina A.A., Bogdanov M.V. 143

9. ПОДХОДЫ К ПОВЫШЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭЛЕКТРОКАТАЛИЗА ЦИТОХРОМА P450 3A4
Королёва П.И., Шумянцева В.В. 144

APPROACHES TO INCREASING THE EFFICIENCY OF THE ELECTROCATALYSIS OF CYTOCHROME P450 3A4
Koroleva P.I., Shumyantseva V.V. 146

10. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ПРОГРЕССИИ ОПУХОЛЕЙ КИШЕЧНИКА
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ КЛЕТОЧНОЙ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ
Лупатов А.Ю., Гисина А.М., Новикова С.Е., Ким Я.С., Сарыглар Р.Ю., Ярыгин К.Н. 147

STUDY OF THE MECHANISMS OF INTESTINAL TUMOR PROGRESSION
USING THE CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY METHODS
Lupatov A.Yu., Gisina A.M., Novikova S.E., Kim Y.S., Saryglar R.Yu., Yarygin K.N. 148

11. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ –
АБИРАТЕРОНА И ГАЛЕТЕРОНА – С ЦИТОХРОМОМ P450 51A1 (CYP51A1)
Масамрех Р.А., Кузиков А.В., Веселовский А.В., Торопыгин И.Ю., Арчаков А.И., Шумянцева В.В. 149

INTERACTIONS OF ANTICANCER DRUGS –
ABIRATERONE AND GALETERONE – WITH CYTOCHROME P450 51A1 (CYP51A1)
Masamrekh R.A., Kuzikov A.V., Veselovsky A.V., Toropygin I.Yu., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. 150

12. РОЛЬ HH-СИГНАЛИНГА В ФИБРОГЕНЕЗЕ И ВОЗМОЖНОСТЬ
ИССЛЕДОВАНИЯ ЕГО НА МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ
Александрова А.А., Мехтиев А.Р., В.А. Золотцев,
Тимошенко О.С., Завьялова М.Г., Санжаков М.А., Щербаков К.А. 150

THE ROLE OF HH-SIGNALING IN FIBROGENESIS AND THE POSSIBILITY OF STUDYING IT ON MODEL SYSTEMS
Alexandrova A.A.„ Mekhtiev A.R., V.A. Zolotsev,
Timoshenko O.S.,Zavyalova M. G., Sanzhakov M. A., Shcherbakov K. A. 152

13. АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ ТЕЛЕМЕДИЦИНСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ДОГОСПИТАЛЬНОЙ
ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ПОДДЕРЖКИ ПРИНЯТИЯ ВРАЧЕБНЫХ РЕШЕНИЙ НА ОСНОВЕ МАШИННОЙ
ОБРАБОТКИ И АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ НЕЙРОСЕТЕВОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ
Муранов А.Н. 154

AUTOMATED TELEMEDICAL SYSTEM FOR PRE-HOSPITAL DIAGNOSTICS OF DISEASES AND SUPPORT FOR MAKING
DECISIONS BASED ON MACHINE PROCESSING AND ANALYSIS OF IMAGES WITH THE USE OF MOSETHETHINE
Muranov A.N. 155

14. ТЕХНОЛОГИИ ИСКУСТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА ДЛЯ МОРФОЛОГИИ: ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ
Файзуллин А.Л., Иванова Е.И., Гринин В.О., Бакулина А.А., Тимашев П.С. 155

ARTIFICIAL INTELLIGENCE TECHNOLOGIES FOR MORPHOLOGY: OPPORTUNITIES AND PROSPECTS
Fayzullin A.L., Ivanova E.I., Grinin V.O., Bakulina A.A., Timashev P.S. 157

15. ВОЗМОЖНОСТИ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА
В ДИСТАНЦИОННОЙ ОЦЕНКЕ ПАРАМЕТРОВ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ
Сагирова Ж., Кузнецова Н., Захаров И., Суворов А., Ларионов В., Чомахидзе П., Копылов Ф. 158

THE POSSIBILITIES OF ARTIFICIAL INTELLIGENCE
IN THE REMOTE ASSESSMENT OF THE 16. PARAMETERS OF THE CARDIOVASCULAR SYSTEM
Sagirova Zh., Kuznetsova N., Zakharov I., Suvorov A., Larionov V., Chomakhidze P., Kopylov Ph. 159

УДК 57.087.1 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-129-130

ОТРАЖАЕТ ЛИ ПРОТЕОМНОЕ «ЗЕРКАЛО» КЛИНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОЖИРЕНИЯ?

Киселева О.И., Арзуманян В.А., Поверенная Е.В., Пятницкий М.А., Ильгисонис Е.В., Згода В.Г., Плотников О.А., Шарафетдинов К.К., Лисица А.В., Тутельян В.А, Никитюк Д.Б., Арчаков А.И., Пономаренко Е.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Россия
119121, ул. Погодинская д. 10, стр. 8
e-mail: arzumanian.victoria@gmail.com

Были собраны паттерны белков, наличие или отсутствие которых позволяет достаточно хорошо прогнозировать вес пациента. Такие протеомные паттерны с высокой предсказательной силой должны способствовать преобразованию потенциальных кандидатов в биомаркеры клинического использования для ранней стратификации терапии ожирения.

Ключевые слова: ожирение, ИМТ, плазма крови, протеомика, масс-спектрометрия.

Ожирение, преимущественно заметное невооруженным глазом, с парадоксальной частотой игнорируется как пациентами, так и клиницистами, и принимает глобальные масштабы. Мультифакторность, высокая коморбидность и динамическая природа ожирения затрудняют понимание его молекулярных основ. Технический прогресс в изучении протеома, финального уровня передачи биологической информации, создал фундамент для разработки персонализированных стратегий лечения различных заболеваний, в том числе и ожирения. Мы задались целью проанализировать корреляцию между картиной, представляемой протеомным «молекулярным зеркалом», и результатами общего и клинического анализа плазмы крови.

Сто четыре пациента, представленные 5 группами (с нормальной и повышенной массой тела, а также с ожирением 1–3 степеней), были клинически и антропометрически охарактризованы. Протеомное профилирование деплетированной и трипсинолизированной плазмы крови было выполнено методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, USA), сопряженном с масс-спектрометром Orbitrap Exactive (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, USA). Для интерпретации результатов, учитывающей особенности стадий пробоподготовки и масс-спектрометрического измерения, применяли платформу SearchGUI. Аннотация протеомного профиля выполнялась с помощью системы онтологии генов Gene Ontology, которая является универсальным структурированным словарем, описывающим свойства генов и белков.

В 104 образцах плазмы крови пациентов суммарно было обнаружено 154 уникальных белка (36 из которых выявлены во всех исследованных образцах плазмы) и проанализирована их связь с различными патологическими процессами. Кластерный анализ показал, что невозможно однозначно разделить пациентов по весу только по результатам стандартных анализов крови. Анализ протеомных данных выявил паттерн из 5 и 18 белков, которые связаны с ожирением.

Исследования белков, циркулирующих в крови, могут предсказывать статус веса пациента. Мы составили два протеомных паттерна, которые предоставляют дополнительную информацию о фенотипе пациента для более персонализированного лечения. Такие протеомные паттерны имеют большой потенциал в качестве биомаркеров, сигнализирующих об изменениях, связанных с ожирением. Это позволит улучшить диагностику метаболических нарушений как у пациентов с нормальным индексом массы тела, так и с ожирением.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственной поддержки создания и развития исследовательских центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» № 075–15-2020-913.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-129-130

DOES PROTEOMIC MIRROR REFLECT CLINICAL CHARACTERISTICS OF OBESITY?

Kiseleva O.I., Arzumanian V.A., Poverennaya E.V., Pyatnitskiy M.A., Ilgisonis E.V., Zgoda V.G., Plotnikova O.A., Sharafetdinov, Lisitsa A.V., Tutelyan V.A., Nikityuk D.B., Archakov A.I., Ponomarenko E.A.

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia
Pogodinskaya Street 10/8, 119121
e-mail: arzumanian.victoria@gmail.com

Protein patterns were collected, the presence or absence of which allows a fairly good prediction of the patient's weight. Such proteomic patterns with high predictive power should facilitate the transformation of potential biomarker candidates for clinical use for the early stratification of obesity therapy.

Keywords: obesity, BMI, blood plasma, proteomics, mass spectrometry

Obesity, predominantly visible to the naked eye, is paradoxically ignored by both patients and clinicians and is taking on a global scale. The multifactorial nature, high comorbidity and dynamic nature of obesity make it difficult to understand its molecular basis. Technological progress in the study of the proteome, the final level of transmission of biological information, has created the foundation for the development of personalized strategies for the treatment of various diseases, including obesity. We set out to analyze the correlation between the picture presented by the proteomic "molecular mirror" and the results of general and clinical analysis of blood plasma.

One hundred and four patients, represented by 5 groups (with normal and overweight, as well as with 1-3 degrees of obesity), were clinically and anthropometrically characterized. Proteomic profiling of blood plasma after depletion and trypsinolysis was performed on an Ultimate 3000 nano-flow HPLC (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, USA) connected to Orbitrap Exactive (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, USA) mass spectrometer equipped with a Nanospray Flex NG ion source (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, USA). The SearchGUI platform was used to interpret the results, considering the specifics of the stages of sample preparation and mass spectrometric measurements. Annotation of the proteomic profile was performed using the Gene Ontology system, which is a universal structured dictionary describing the properties of genes and proteins.

In 104 samples of patients' blood plasma, a total of 154 unique proteins were found (36 of which were detected in all studied plasma samples) and their relationship with various pathological processes was analyzed. Cluster analysis showed that it is impossible to unambiguously divide patients by weight based on the results of standard blood tests alone. Proteomic data analysis reveals a pattern of 5 and 18 proteins associated with obesity.

Studies of proteins circulating in the blood can predict a patient's weight status. We have compiled two proteomic patterns that provide additional information about the patient's phenotype for more personalized treatment. Such proteomic patterns have great potential as biomarkers signaling changes associated with obesity. This will improve the diagnosis of metabolic disorders in both patients with normal body mass index and obesity.

This research was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of state support for the creation and development of World-Class Research Centers "Digital biodesign and personalized healthcare" № 075-15-2020-913.

УДК 621.039.75 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-130-132

«ВИТРИНА» БИООБРАЗЦОВ: СПОСОБ КОММУНИКАЦИИ МЕЖДУ ИССЛЕДОВАТЕЛЕМ И ДЕРЖАТЕЛЕМ БИОБАНКА.

Букреева А.С.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Россия.
119121, Россия Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8.
e-mail: 3385142@gmail.com

Доступность и открытость информации о биообразцах, имеющихся в наличии у биобанков является важной частью для обеспечения быстрого и качественного выполнения исследовательских работ. Веб-репозиторий биологических образцов «Витрина» представляет возможность, для прямой коммуникации между исследователем и держателем биообанка.

Ключевые слова: персонализированное здравоохранение; биобанк; цифровой биодизайн; биообразцы; биомедицинские исследования.

Для успешного развития персонализированной биомедицины необходимо решить множество вопросов, связанных с использованием различных типов биоматериала, как в исследовательских, так и в клинических целях. Это определяет актуальность биобанков и подчеркивает важность сотрудничества и коммуникации между разными сторонами исследовательской отрасли. В 2011 года Европейская комиссия отобразила первостепенную роль биобанка в развитии текущих и будущих исследований в области персонализированной медицины. [1]. Современные биобанки функционируют как сложные структуры, основанные на взаимодействии клиницистов, исследователей, медицинского персонала и специалистов по биоэтике. [2]. Совокупность этих факторов актуализирует задачу обеспечения качественного и удобного способа коммуникации разных сторон.

Для решения этой задачи был предложен проект реализации веб-репозитория биологических образцов «Витрина», в котором держатели биобанков, с одной стороны, и заинтересованные исследователи, с другой стороны, могут осуществлять коммуникацию по вопросам передачи биооборазцов и выполнения совместных научно-практических проектов, в том числе в сфере цифровизации здравоохранения. В предложенном решении заинтересованный исследователь может в доступной форме получить всю информацию об имеющихся у биобанка образцах, а также оформить запрос на получение интересующих образцов в работу или запрос на получение информации о результатах уже выполненных аналитических измерений. Держатель биобанка, в свою очередь, получает удобное решения, для сбора и обработки запросов.

Развитие и популяризация такого ресурса может в будущем значительно упростить исследователям поиск материала для работы и тем самым ускорить реализацию исследовательских проектов, обеспечивая устойчивое развитие персонализированной медицины в стране.

Работа выполнена при финансовой поддержки Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственной программы создания и развития Исследовательских центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» № 75-15-2020- 913.

Литература

1. *Zika E. et al. A European survey on biobanks: trends and issues //Public health genomics. – 2011. – T. 14. – №. 2. – C. 96-103.*
2. *Anisimov S. V. et al. National Association of Biobanks and Biobanking Specialists: 2. New Community for Promoting Biobanking Ideas and Projects in Russia //Biopreservation and Biobanking. – 2021. – T. 19. – №. 1. – C. 73-82.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-130-132

«SHOWCASE» OF BIOSPECIMEN: METHOD OF COMMUNICATION BETWEEN RESEARCHER AND BIOBANK HOLDER.

Bukreeva A.S.

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia
119121 Moscow, Russia, Pogodinskaya st. 10 build. 8

Approachability and high quality of the information on bio-samples in biobanks is a function for the efficient research work. The web-repository of biological samples "Vitrina" provides an opportunity for direct communication between researcher and the holder of the biobank.

Keywords: personalized healthcare; biobank; digital biodesign; biospecimen; biomedical research.

Successful development of personalized healthcare needs solution for many issues associated with the use of various types of biomaterial, both for research and clinical purposes. This defines the relevance of biobanks and highlights the importance of collaboration and communication between different parties in the research industry. In 2011, the European Commission specified the primary role of the biobank in the development of current and future research in the field of personalized healthcare. [1]. Modern biobanks function as complex structure based on the interaction of clinicians, researchers, medical personnel and bioethics specialists. [2]. Combination of these factors actualizes the task of providing a high-quality and convenience of communication between different parties.

The project «Showcase» was proposed to solve this problem. The main idea of it is implementation of a web repository of biological samples of the biobank holders, on one side, and interested researchers, on another, can communicate on the transfer of biological samples and the implementation of joint scientific and practical projects, including digitalization of healthcare. In the proposed solution, an interested researcher can receive all information about the samples in an accessible form from the biobank, and also can either require samples of interest for work or information on the results of already performed analytical measurements. The holder of the biobank receives a convenient solution for collecting and processing requests.

The development and popularization of such a resource in the future can significantly simplify the search for researchers' work materials. More than that, it may accelerate the implementation of research projects, ensuring the sustainable development of personalized medicine in the country.

This work was financed by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of state support for the creation and development of World-Class Research Centers "Digital biodesign and personalized healthcare" No. 75-15-2020-913.

References

1. *Zika E. et al. A European survey on biobanks: trends and issues //Public health genomics. – 2011. – Т. 14. – №. 2. – С. 96-103.*
2. *Anisimov S. V. et al. National Association of Biobanks and Biobanking Specialists: New Community for Promoting Biobanking Ideas and Projects in Russia //Biopreservation and Biobanking. – 2021. – Т. 19. – №. 1. – С. 73-82.*

УДК 004.942 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-132-133

ВЫЧИСЛИТЕЛЬНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ СТЕНОЗОВ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Василевский Ю.В., Гамилов Т.М., Симаков С.С., Копылов Г.В., Копытов Ф.Ю., Гогниева Д.Г.

Сеченовский Университет, 119435, Москва, Большая Пироговская ул., 2, стр. 4
e-mail: yuri.vassilevski@gmail.com

Разработана и валидирована цифровая технология оценки фракционного резерва кровотока, ключевой диагностической характеристики стенозов коронарных артерий. Технология имеет достаточно высокий уровень точности и может быть использована в реальной клинической практике с целью повышения диагностической эффективности рутинной компьютерной томографии коронарных артерий.

Ключевые слова: фракционный резерв кротовока, персонализированная модель кровотока

В настоящее время инвазивное измерение фракционного резерва кровотока (ФРК) является одной из основных методик, применяемых для выявления индуцированной ишемии миокарда. ФРК описывает долю максимально достижимого кровотока в участке миокарда при наличии стеноза в его питающей коронарной артерии по отношению к нормальному максимально достижимому кровотоку в том же участке в гипотетической ситуации нормального тока крови по этой же артерии. Современные достижения в вычислительной гидродинамике и компьютерном моделировании позволяют рассчитать ФРК неинвазивно (ФРКкт) на основании данных компьютерной томографии-ангиографии (КТ-АГ), выполненной по стандартному протоколу, в покое, без увеличения лучевой нагрузки, модификации протокола исследования и применения различных вазодилатирующих препаратов.

Разработана цифровая технология оценки ФРК, основанная на усредненных по поперечному сечению уравнениях Навье–Стокса, описывающих движение вязкой несжимаемой жидкости по сети эластичных трубок. На входе в сеть (корень аорты) ставятся граничные условия в виде зависимости объемного кровотока от времени, соответствующей сердечному выбросу. Валидация технологии оценки ФРК проходила путём сравнения предсказанного моделью ФРК и инвазивно измеренного ФРК. В исследование было включено 57 пациентов.Для анализа по пациентам чувствительность составила 100% (95% ДИ; 43,8-100), специфичность — 100% (95% ДИ; 51-100), (P<0,05); прогностическая ценность положительного результата — 100% (95% ДИ; 43,8-100), прогностическая ценность отрицательного результата — 100% (95% ДИ; 51-100).

Результаты проведенного исследования показывают, что методика имеет достаточно высокий уровень точности и может быть использована в реальной клинической практике с целью повышения диагностической эффективности рутинной компьютерной томографии коронарных артерий. Дальнейшие исследования должны способствовать усовершенствованию алгоритмов, что позволит повысить диагностическую эффективность и сократить время на обработку данных.

Литература

1. *D.Gognieva, et al. Noninvasive Assessment of the Fractional Flow Reserve with the CT FFRc 1D Method: Final Results of a Pilot Study. Global Heart. 2021; 16(1): 1.*
2. *Yu.Vassilevski, et al. Personalized Computational Hemodynamics. Models, Methods, and Applications for Vascular Surgery and Antitumor Therapy. Academic Press, 2020*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-132-133

COMPUTATIONAL TECHNOLOGY FOR NON-INVASIVE DIAGNOSIS OF CORONARY ARTERY STENOSIS IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

Vassilevski Y.V., Gamilov T.M., Simakov S.S., Kopytov G.V., Kopylov P.Y., Gognieva D.G.

Sechenov University, 119435, Moscow, Bolshaya Pirogovskaya 2-4
e-mail: yuri.vassilevski@gmail.com

A digital technology for assessing the fractional flow reserve, a key diagnostic characteristic of coronary artery stenosis, has been developed and validated. The technology has a sufficiently high level of accuracy and can be used in real clinical practice in order to increase the diagnostic efficiency of routine computed tomography of the coronary arteries.

Key words: fractional flow reserve, personalized model of blood flow

Currently, invasive measurement of fractional blood flow reserve (FFR) is one of the main methods used to detect induced myocardial ischemia. FFR describes the proportion of the maximum attainable blood flow in the myocardial area in the presence of stenosis in its feeding coronary artery in relation to the normal maximum attainable blood flow in the same area in a hypothetical situation of normal blood flow through the same artery. Modern advances in computational fluid dynamics and computer modeling make it possible to calculate FFR non-invasively (FFRct) based on computed tomography-angiography (CT-AG) data, performed according to a standard protocol, at rest, without increasing radiation exposure, modifying the study protocol and using various vasodilating drugs.

A computational technology for estimating the FFR has been developed, based on the cross-section-averaged Navier – Stokes equations describing the motion of a viscous incompressible fluid in a network of elastic tubes. At the entrance to the network (the aortic root), boundary conditions are set in the form of the dependence of the volumetric blood flow on the time corresponding to cardiac output. The validation of the FFR assessment technology was carried out by comparing the FFR predicted by the model and the invasively measured FFR. The study included 57 patients. For the analysis of these patients, the sensitivity was 100% (95% CI; 43.8-100), specificity - 100% (95% CI; 51-100), ($P < 0.05$); positive predictive value - 100% (95% CI; 43.8-100), negative predictive value - 100% (95% CI; 51-100). The results of the study show that the technique has a sufficiently high level of accuracy and can be used in real clinical practice in order to increase the diagnostic efficiency of routine computed tomography of the coronary arteries. Further research should lead to improved algorithms that will improve diagnostic efficiency and reduce processing time.

References

1. *D.Gognieva, et al. Noninvasive Assessment of the Fractional Flow Reserve with the CT FFRc 1D Method: Final Results of a Pilot Study. Global Heart. 2021; 16(1): 1.*
2. *Yu.Vassilevski, et al. Personalized Computational Hemodynamics. Models, Methods, and Applications for Vascular Surgery and Antitumor Therapy. Academic Press, 2020*

УДК 519.876.5 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-134-136

ЦИФРОВОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ IN VITRO ИССЛЕДОВАНИЙ

Ефремов Ю.М., Ермолаева А.В., Владимиров Г.К., Гордлеева С.Ю., Заикин А.А., Тимашев П.С.

Центра «Цифрового биодизайна и персонализированного здравоохранения» Сеченовского университета, Москва, Россия
119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8
e-mail: efremov_yu_m@staff.sechenov.ru

В данной работы была разработана интегрированная математическая модель клетки печени, метаболизма холестерина, а также взаимодействия с лекарственными средствами. Модель воспроизводила известную биологию регуляции холестерина, что подтверждает её потенциал для минимизации клеточных исследований при первичном тестировании новых ЛС для кардиологии.

Ключевые слова: математическое моделирование, метаболизм холестерина, липопротеины, статины, ингибиторы PCSK9, гепатоциты.

Регулирование уровня холестерина является важным аспектом здоровья человека. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), связанные с уровнем холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), остаются важной причиной смертности в развивающихся и развитых странах [1,2]. Все клетки обладают способностью вырабатывать и регулировать холестерин, но печень в первую очередь отвечает за метаболизм холестерина. Область математического моделирования метаболизма липопротеинов, как и область цифрового моделирования *in vitro* исследований в целом, интенсивно развивается, стремясь воспроизвести известные эффекты гиперхолестеринемии и различные методы лечения против нее [3–5]. В конечном итоге такая модель поможет исследователям как в разработке, так и в количественном сравнительном анализе различных фармакологических подходов.

Целью данной работы является разработка и исследование интегрированной цифровой модели клетки печени, метаболизма холестерина, а также взаимодействия с лекарственными препаратами (статинами и ингибиторами PCSK9) в условиях *in vitro*. К задачам проекта относятся разработка системы обыкновенных дифференциальных уравнений, описывающих интересующие процессы; их численное решение с визуализацией и анализом результатов; тестирование с помощью данной модели эффективности новых лекарств против гиперхолестеринемии (малые молекулы – ингибиторы PCSK9).

В литературе можно найти несколько математических моделей, описывающих метаболизм холестерина и липопротеинов [3–6]. В данной работе за основу была взята одна из наиболее продвинутых моделей, описывающих метаболизм на клеточном уровне [3]. Нами были введены дополнительные уравнения, учитывающие роль регуляторного белка PCSK9 в метаболизме холестерина, а также уравнения, описывающие молекулярные механизмы действия лекарственных средств (ЛС), статинов и ингибиторов PCSK9. Подобное совмещение двух типов ЛС в одной модели было произведено впервые. Также впервые был смоделирован эффект от нового типа ингибиторов PCSK9, малых молекул, и проведено сравнение эффективности со стандартно используемыми антителами.

Представленная в данной работе модель состоит из 21 обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ), описывающих биосинтез холестерина и эндоцитоз липопротеинов в клетках печени. Модель рассматривает процессы в трёх основных компартментах: ядро, цитоплазма, окруженная клеточной мембраной, и внеклеточная среда. Кроме того, в работе смоделирован эффект приёма статинов – наиболее часто используемых препаратов для снижения уровня холестерина в крови, а также моделируется терапия с ингибиторами белка PCSK9 (моноклональными антителами на данный белок и малыми молекулами).

Разработка и анализ модели проводились в среде Microsoft Visual Studio. Разработанная безразмерная система дифференциальных уравнений с соответствующими параметрами была решена с использованием метода Рунге-Кутты 4-го порядка точности. Для визуализации моделирования системы использовалась среда Matlab.

Модель была протестирована на способность воспроизводить известные биохимические эффекты семейной гиперхолестеринемии, терапии статинами и ингибиторами PCSK9. В каждом случае модель воспроизводит известное биологическое поведение. Основными рассматриваемыми параметром выступали уровни липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и очень низкой плотности (ЛПОНП) во внеклеточной среде. При моделировании семейной гиперхолестеринемии, а также при повышенных уровнях PCSK9 наблюдали увеличение концентрации ЛПНП и ЛПОНП в среде. В то же время, при

ингибировании ГМГ-КоА-редуктазы статинами и при ингибировании PCSK9 моноклональными антителами наблюдалось уменьшение концентрации ЛПНП и ЛПОНП в среде. Также стоит отметить, что изменение уровня экспрессии оказывало слабое влияние по сравнению с введением дополнительного PCSK9 в среду.

Разработанная математическая модель может выступить инструментом, позволяющим минимизировать клеточные исследования при первичном тестировании новых лекарственных средств для кардиологии. Это позволит как сократить время тестирования, так и эффективнее вести поиск новых средств-кандидатов.

Таким образом, в данной работе была разработана, решена и проанализирована система ОДУ, описывающих ключевые механизмы биосинтеза холестерина и метаболизма липопротеинов в клетках печени. Анализ показал, что модель качественно воспроизводит известную биологию регуляции холестерина. Данная работа продемонстрировала, что математическое моделирование является хорошим инструментом, потенциально позволяющим минимизировать клеточные исследования при первичном тестировании новых лекарственных средств для кардиологии.

Литература

1. *Zou Z. et al. Time Trends in Cardiovascular Disease Mortality Across the BRICS // Circulation. 2020. Vol. 141, № 10. P. 790–799.*
2. *Roth G.A. et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 // Lancet. 2018. Vol. 392, № 10159. P. 1736–1788.*
3. *Pool F., Sweby P.K., Tindall M.J. An integrated mathematical model of cellular cholesterol biosynthesis and lipoprotein metabolism // Processes. 2018. Vol. 6, № 8. P. 134.*
4. *Kubica K., Balbus J. Mathematical modeling of cholesterol homeostasis // Control Theory in Biomedical Engineering. Elsevier, 2020. P. 43–61.*
5. *Paalvast Y., Kuivenhoven J.A., Groen A.K. Evaluating computational models of cholesterol metabolism // Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids. 2015. Vol. 1851, № 10. P. 1360–1376.*
6. *Sokolov V. et al. Comparative quantitative systems pharmacology modeling of anti-PCSK9 therapeutic modalities in hypercholesterolemia // J. Lipid Res. 2019. Vol. 60, № 9. P. 1610–1621.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-134-136

DIGITAL MODELING OF IN VITRO RESEARCH

Efremov Yu.M., Ermolaeva A.V., Vladimirov G.K., Gordleeva S.Yu., Zaikin A.A., Timashev P.S.

World-Class Research Centers "Digital biodesign and personalized healthcare", Sechenov University, Moscow, Russia 119991, Moscow, Trubetskaya st., 8
e-mail: efremov_yu_m@staff.sechenov.ru

In this work, an integrated mathematical model of the liver cell, cholesterol metabolism, and drug interactions was developed. The model reproduced the well-known biology of cholesterol regulation, which confirms its potential for minimizing cellular research in the initial testing of new drugs for cardiology.

Keywords: mathematical modeling, cholesterol metabolism, lipoproteins, statins, PCSK9 inhibitors, hepatocytes.

Cholesterol regulation is an important aspect of human health. Cardiovascular disease (CVD) associated with a high level of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol remains an important cause of death in developing and developed countries [1,2]. All cells can produce and regulate cholesterol production, but the liver is primarily responsible for cholesterol metabolism. The field of mathematical modeling of lipoprotein metabolism, as well as the field of digital modeling of in vitro studies in general, is intensively developing, striving to reproduce the known effects of hypercholesterolemia and various methods of treatment against it [3–5]. Ultimately, such a model will help researchers in both the development and quantitative comparative analysis of different pharmacological approaches.

This work aims to develop and study an integrated digital model of the liver cell, cholesterol metabolism, and interaction with drugs (statins and PCSK9 inhibitors) in vitro. The tasks of the project include the development

of a system of ordinary differential equations describing the processes of interest; their numerical solution with visualization and analysis of results; testing the effectiveness of new drugs against hypercholesterolemia (small molecules - PCSK9 inhibitors) with this model.

In the literature, one can find several mathematical models describing the metabolism of cholesterol and lipoproteins [3–6]. In this work, one of the most advanced models describing metabolism at the cellular level was taken as a basis [3]. We have introduced additional equations that consider the role of the regulatory protein PCSK9 in cholesterol metabolism, as well as equations describing the molecular mechanisms of action of such drugs like statins and PCSK9 inhibitors. Such a combination of two types of drugs in one model was produced for the first time. Also, for the first time, the effect of a new type of PCSK9 inhibitors, small molecules, was modeled, and the effectiveness was compared with commonly used antibodies.

The model presented in this work consists of 21 ordinary differential equations (ODE) describing the biosynthesis of cholesterol and endocytosis of lipoproteins in liver cells. The model considers processes in three main compartments: the nucleus, the cytoplasm surrounded by the cell membrane, and the extracellular environment. In addition, the work simulates the effect of taking statins - the most commonly used drugs to lower blood cholesterol levels and also simulates therapy with inhibitors of the PCSK9 protein (monoclonal antibodies for this protein and small molecules).

The development and analysis of the model were carried out in the Microsoft Visual Studio environment. The developed dimensionless system of differential equations with the corresponding parameters was solved using the Runge-Kutta method of the 4th order of accuracy. The Matlab environment was used to visualize the conducted simulations.

The model was tested for its ability to mimic the known biochemical effects of familial hypercholesterolemia, statin therapy, and PCSK9 inhibitors. In each case, the model reproduces a known biological behavior. The main parameters considered were the levels of low-density (LDL) and very-low-density lipoproteins (VLDL) in the extracellular environment. When modeling familial hypercholesterolemia, as well as at elevated levels of PCSK9, an increase in the concentration of LDL and VLDL in the medium was observed. At the same time, when HMG-CoA reductase was inhibited by statins and when PCSK9 was inhibited by monoclonal antibodies, a decrease in the concentration of LDL and VLDL in the medium was observed. It is also worth noting that the change in the expression level had little effect compared to the introduction of additional PCSK9 into the medium.

The developed mathematical model can act as a tool to minimize cellular research in the initial testing of new drugs for cardiology. This will allow both to reduce testing time and to more efficiently search for new drug candidates.

Thus, in this work, a system of ODEs was developed, solved, and analyzed, describing the key mechanisms of cholesterol biosynthesis and lipoprotein metabolism in liver cells. The analysis showed that the model qualitatively reproduces the known biology of cholesterol regulation. This work has demonstrated that mathematical modeling is an efficient tool, potentially allowing to minimize cellular research in the initial testing of new drugs for cardiology.

References

1. *Zou Z. et al. Time Trends in Cardiovascular Disease Mortality Across the BRICS // Circulation. 2020. Vol. 141, № 10. P. 790–799.*
2. *Roth G.A. et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 // Lancet. 2018. Vol. 392, № 10159. P. 1736–1788.*
3. *Pool F., Sweby P.K., Tindall M.J. An integrated mathematical model of cellular cholesterol biosynthesis and lipoprotein metabolism // Processes. 2018. Vol. 6, № 8. P. 134.*
4. *Kubica K., Balbus J. Mathematical modeling of cholesterol homeostasis // Control Theory in Biomedical Engineering. Elsevier, 2020. P. 43–61.*
5. *Paalvast Y., Kuivenhoven J.A., Groen A.K. Evaluating computational models of cholesterol metabolism // Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids. 2015. Vol. 1851, № 10. P. 1360–1376.*
6. *Sokolov V. et al. Comparative quantitative systems pharmacology modeling of anti-PCSK9 therapeutic modalities in hypercholesterolemia // J. Lipid Res. 2019. Vol. 60, № 9. P. 1610–1621.*

УДК 612.1 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-137-139

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ОБУЧАЕМЫЕ СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО КОНТРОЛЯ КИСЛОРОДНОГО СТАТУСА ТКАНЕЙ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

А.Ю.Зайцева[1], **М.С.Мазинг**[1,2], **С.А.Авдюшенко**[3]

[1] *Институт Аналитического Приборостроения РАН, С-Петербург*
[2] *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, С.-Петербург*
[3] *Военно-медицинская Академия им.С.М.Кирова, С.-Петербург*
э-почта: anna@da-24.ru

Разработана и исследована оптическая сенсорная система анализа интегрального кислородного статуса тканей человека на основе информационных технологий обучения и распознавания образов.

Ключевые слова: сенсорная система, оптические сенсоры, машинное обучение, метод главных компонент, кислородный статус

Транспорт кислорода в тканях регулируется через изменения сродства гемоглобина к кислороду, при гипоксии происходит образование метаформ гемопротеидов- цитохромов, при патологических процессах в тканях повышается уровень порфиринов, с возрастом накапливается липофусцин, протопорфирин IX. Анализ спектра тканей организма человека позволяет судить об интегральном состоянии кровеносной системы человека в целом.

Разработана и исследована диагностическая система анализа кислородного статуса тканей человека, состоящая из двух модулей: оптико-электронного и вычислительно-информационного. Сущность метода заключается в регистации спектральных интенсивностей рассеяной части света, возвращающейся обратно к поверхности кожи и выходящей наружу, где фотоприемник регистрирует его спектральные интенсивности, которые изменяются после оптических процессов в тканях в зависимости от наличия определенных веществ в исследуемом участке тела. Оптико-электронный модуль представлен многоканальным сенсорным интегральным оптическим анализатором спектров [1, 2]. Вычислительно-информационный модуль, осуществляющий общее управление и отображение полученных результатов, представлен математической моделью статистических алгоритмов обработки и анализа многомерных данных с использованием технологий машинного обучения, распознавания и визуализации образов.

Произведен кластерный анализ результатов измерений диагностической системы с применением методов искусственных нейронных сетей в виде самоорганизующихся карт Кохонена, приведенный на рис. 1, и метода главных компонент. Результаты кластеризации испытуемых различными методами подтвердили тенденцию испытуемых к группированию и позволили произвести оценку устойчивости и качества созданного кластерного решения.

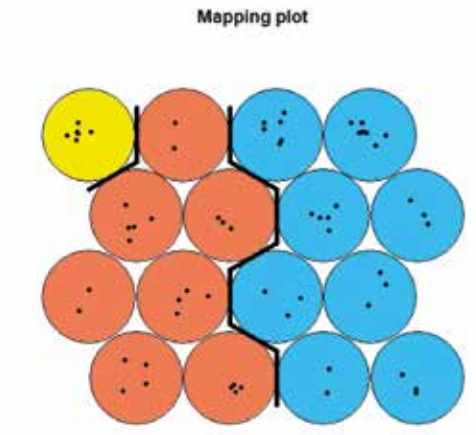


Рис. 1. Кластеризация экспериментальных данных методом искусственных нейронных сетей в виде самоорганизующихся карт Кохонена на 3 кластера

Полученные результаты позволяют рекомендовать разработанную неинвазивную оптическую сенсорную систему в качестве аппаратно-программного комплекса поддержки принятия врачебных решений, а также как автоматизированную систему экспресс-диагностики интегрального кислородного обеспечения тканей человека.

Литература

1. *А. Ю. Зайцева, М. С. Мазинг, Ю. Я. Кисляков. Мультисенсорная оптическая система неинвазивного контроля кислородного обеспечения тканей человека при функциональной нагрузке // Научное приборостроение. – 2020. – Т. 30, №. 4. – С. 106-112.*
2. *Zaitceva A.Yu., Kislyakova L.P., Kislyakov Yu.Ya., Avduchenko S.A. Development of a multi-sensor analytical trainable system for non-invasive evaluation of adaptedness status of hazardous occupation specialists // Journal of Physics: CS. —2019. — Vol. 1400, 033022.*

UDC 612.1 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-137-139

DIAGNOSTIC TRAINING SENSOR SYSTEMS FOR PERSONALIZED CONTROL OF OXYGEN STATUS OF HUMAN TISSUE TISSUE

A.Yu.Zaitceva[1], **M.S. Mazing**[1,2], **S.A. Avdyushenko**[3]

[1] *Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg*
[2] *Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg*
[3] *SM Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg*
e-mail: anna@da-24.ru

An optical sensor system for the analysis of the integral oxygen status of human tissues has been developed and investigated on the basis of information technologies for training and pattern recognition.

Keywords: sensory system, optical sensors, machine learning, principal component analysis, oxygen status

Oxygen transport in tissues is regulated through changes in the affinity of hemoglobin to oxygen, with hypoxia, the formation of hemoprotein-cytochrome metaforms occurs, with pathological processes in the tissues, the level of porphyrins increases, lipofuscin and protoporphyrin IX accumulate with age. Analysis of the spectrum of tissues of the human body makes it possible to judge the integral state of the human circulatory system as a whole.

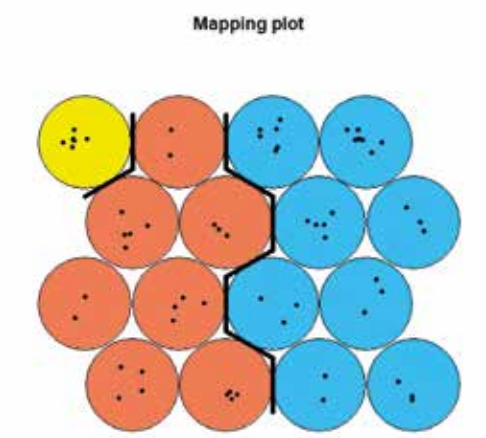


Fig. 1. Clustering of experimental data by the method of artificial neural networks in the form of self-organizing Kohonen maps into 3 clusters

A diagnostic system for analyzing the oxygen status of human tissues has been developed and investigated, consisting of two modules: optoelectronic and computational information. The essence of the method consists in recording the spectral intensities of the scattered part of the light returning back to the skin surface and going out, where the photodetector registers its spectral intensities, which change after optical processes in tissues,

depending on the presence of certain substances in the investigated area of the body. The optoelectronic module is a multichannel sensor integrated optical spectrum analyzer [1, 2]. The computational and information module that carries out general management and display of the results obtained is represented by a mathematical model of statistical algorithms for processing and analyzing multidimensional data using machine learning technologies, pattern recognition and visualization.

A cluster analysis of the results of measurements of the diagnostic system was carried out using the methods of artificial neural networks in the form of self-organizing Kohonen maps, shown in Fig. 1, and the method of principal components. The results of clustering of subjects by various methods confirmed the tendency of subjects to grouping and made it possible to assess the stability and quality of the created cluster solution.

The results obtained make it possible to recommend the developed non-invasive optical sensor system as a hardware-software complex to support medical decision-making, as well as an automated system for express diagnostics of integral oxygen supply of human tissues.

References

1. *A.Yu. Zaitseva, M. S. Masing, Yu. Ya. Kislyakov. Multisensor optical system for non-invasive monitoring of oxygen supply to human tissues under functional load // Scientific instrument engineering. - 2020. - T. 30, no. 4. - S. 106-112.*
2. *Zaitceva A. Yu., Kislyakova L.P., Kislyakov Yu.Ya., Avduchenko S.A. Development of a multi-sensor analytical trainable system for non-invasive evaluation of adaptedness status of hazardous occupation specialists // Journal of Physics: CS. -2019. - Vol. 1400, 033022.*

УДК 577.151 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-139-140

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПРОФИЛЬ ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА – СОВРЕМЕННЫЕ ТРЕНДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Ильгисонис Е.В., Тарбеева С.Е., Лисица А.В, Пономаренко Е.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Россия
119121, Россия, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8
e-mail: ilgisonis.ev@gmail.com

Получены сведения о трендах исследований молекулярных профилей здоровых людей

Ключевые слова: протеомика, метаболомика, текст-майнинг

Одним из важнейших аспектов медицины является исследование молекулярных профилей здоровых людей и их изменчивости с течением времени. Как правило, наибольшее значение имеют молекулярные профили крови, включая протеомику, транскриптомику, липидомику, метаболомику, аутоантитела и профили иммунных клеток, дополненные составом кишечной микробиоты.

С использованием разработанного веб-интерфейса для оценки трендов научных исследований в области молекулярного профилирования здорового человека были проанализированы более 100 000 научных публикаций PubMed/MEDLINE, проиндексированных терминами MeSH.

С использованием Веб-интерфейса загружали данные целевой выборки по запросам вида ["healthy human"[All Fields] ". Выборке формировали за период 2011-2021 гг. Таким образом, были получены следующие типы данных: MeSH-термин; количество статей, содержащих данный MeSH-термин в их аннотации; общее количество статей в выборке.

На следующем этапе проводили анализ полученных данных.

MeSH-термины, которые ассоциированы в выборке с пятью и менее публикациями, удаляли из рассмотрения для уменьшения влияния редко используемых терминов и повышения достоверности анализа. С этой же целью объединяли MeSH-термины, аннотированные различными уточняющими подзаголовками (т.н. qualifiers). Например, термины "Neoplasms/diagnosis" и "Neoplasms/drug therapy" рассматривали как единый термин “Neoplasms”.

В иерархии MeSH-терминов существует 16 категорий верхнего уровня [https://MeSHb.nlm.nih.gov/treeView]. В данной работе анализ был ограничен MeSH-терминами, которые являются потомками следующих трех категорий, а именно: “Diseases” (C), “Chemicals and Drugs” (D) и “Analytical, Diagnostic and Therapeutic Techniques, and Equipment” (E).

Анализ изменения частот встречаемости MeSH-термина во времени (динамика и тренды) проводили с использованием теста Манна-Кендалла (nonparametric Mann-Kendall trend test), предназначенного для выявления постоянно возрастающих или убывающих трендов (Kendall, 1975; Mann, 1945).

Мы считали, что существует достоверный тренд в динамике частоты использования термина, в том случае, если p-value теста Манна-Кендалла не превышал порогового значения 0,01. Поправку на множественные сравнения не применяли вследствие ограниченной мощности теста, поскольку для каждого термина имелось максимум 9 временных значений.

Таким образом были определены дизайны экспериментов, методологическая база и биологические образцы, наиболее часто использующиеся в исследованиях здоровых людей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» №075-15-2020-913

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-139-140

MOLECULAR PROFILE OF A HEALTHY PERSON – MODERN RESEARCH TRENDS

Ilgisonis E.V., Tarbeeva S.E., Lisitsa A.V., Ponomarenko E.A.

FSBSI "Research Institute of Biomedical Chemistry named after V.N. Orekhovich ", Moscow, Russia
10/8, Pogodinskaya str., Moscow, 119121 – Russia,
e-mail: ilgisonis.ev@gmail.com

Information about the trends in studies of molecular profiles of healthy people has been obtained.

Keywords: proteomics, metabolomics, text-mining

One of the most important aspects of medicine is the study of the molecular profiles of healthy people and their variability over time. Typically, blood molecular profiles are of greatest importance, including proteomics, transcriptomics, lipidomics, metabolomics, autoantibodies, and immune cell profiles supplemented by the composition of the gut microbiota.

More than 100,000 PubMed / MEDLINE scientific publications indexed by MeSH terms were analyzed using the developed web interface to assess trends in scientific research in the field of molecular profiling of a healthy person.

Using the Web interface, the target sample data was loaded by queries of the form ["healthy human" [All Fields]". The sample was formed for the period 2011-2021. Thus, the following data types were obtained: MeSH-term; number of articles containing this MeSH term in their abstract; total number of articles in the sample.

At the next stage, the data obtained were analyzed.

MeSH terms that were associated in the sample with five or less publications were removed from consideration to reduce the influence of rarely used terms and increase the reliability of the analysis. For the same purpose, MeSH terms were combined, annotated with various qualifying subheadings (the so-called qualifiers). For example, the terms "Neoplasms / diagnosis" and "Neoplasms / drug therapy" were treated as a single term "Neoplasms".

There are 16 top-level categories in the MeSH term hierarchy [https://MeSHb.nlm.nih.gov/treeView]. In this paper, the analysis was limited to MeSH terms, which are descendants of the following three categories, namely: “Diseases” (C), “Chemicals and Drugs” (D) and “Analytical, Diagnostic and Therapeutic Techniques, and Equipment” (E) ...

The analysis of changes in the frequency of occurrence of the MeSH term over time (dynamics and trends) was carried out using the Mann-Kendall test (nonparametric Mann-Kendall trend test), designed to identify constantly increasing or decreasing trends (Kendall, 1975; Mann, 1945).

We believed that there is a significant trend in the dynamics of the frequency of use of the term, if the p-value of the Mann-Kendall test did not exceed the threshold value of 0.01. Correction for multiple comparisons was not applied due to the limited power of the test, as there were a maximum of 9 time values for each term.

Thus, the experimental designs, methodological base and biological samples, most often used in studies of healthy people, were determined.

This work was financed by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of state support for the creation and development of World-Class Research Centers "Digital biodesign and personalized healthcare" №075-15-2020-913

УДК 621.039.75 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-141-142

НЕЙРОННАЯ СЕТЬ ДЛЯ КЛАССИФИКАЦИИ НЕОТНЕСЁННЫХ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ ДАННЫХ В ПРОТЕОМЕТАБОЛОМИКЕ.

Кайшева А.Л., Петровский Д.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Россия.
119121, Россия Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8.
e-mail: kaysheva3@gmail.com

Протеомные (MASCOT, Andromeda, OMSSA и др.) и метаболомные (Scripps, AMDIS и др.) поисковые алгоритмы идентификации ограничены референтными библиотеками и, вследствие, этого теряется большой массив данных (модифицированные белки, изоформы). Минуя этап идентификации, можно значительно увеличить объём данных для задач классификации. Это позволяет успешно кластеризовать исследуемые классы ценой информации о молекулярных категориальных предикторах.

Ключевые слова: онкология; нейронная сеть; системная биология; биоинформатика; протеомика; метаболомика; мультиомиксные данные.

Одним из методов машинного обучения, способных решать задачи классификации на зашумленных данных, является метод свёрточных нейронных сетей (СНС).

Цель: создание нейронной сети для классификации пациентов с близкими по этиологии и патогенезу заболеваниями на примере различных онкофенотипов.

Мы провели масс-спектрометрическое протео-метаболомное исследование пациентов с тремя видами рака (рак яичников, почек и предстательной железы), из них две были квалифицированы как гендерно-специфичные, а также условно-здоровых участников исследования. Полученные данные были разделены на два набора – для обучения и валидации СНС, без предварительной идентификации.

Для анализа и классификации патологий была разработана нейронная сеть с архитектурой «остаточных свёрток» (1D-Residual CNN), входными данными для которой являлись непосредственно данные масс-спектрометрического сигнала. Отличительной особенностью глубоких свёрточных нейронных сетей является их способность принимать данные в исходном виде и преобразовывать их в карты признаков. В нашей реализации нейронной сети данные масс-спектрометрического сигнала в MGF-формате перед подачей на вход нейронной сети были минимально преобразованы (нормализация и фильтрация шума). Для данной сети были достигнуты следующие показатели классификации патологий: достоверность (accuracy): 0.89 и отклик (recall): 0.87.

Обученная нейросеть с высокой достоверностью различает типы онкопатологий между собой, используя на входе метаболомные и протеомные спектры плазмы крови пациентов.

Работа выполнена при финансовой поддержки Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственной программы создания и развития Исследовательских центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» № 75-15-2020-913.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-141-142

NEURAL NETWORK AS AN APPROACH TO THE CLASSIFICATION OF UNASSIGNED LC-MS DATA IN PROTEOMETABOLOMICS.

Kaysheva A.L., Petrovsky D.V.

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia
119121 Moscow, Russia, Pogodinskaya st. 10 build. 8

Proteomic (MASCOT, Andromeda, OMSSA, etc.) and metabolomic (Scripps, AMDIS, etc.) search algorithms for identification are limited to reference libraries and, as a result, a large amount of data is lost (modified proteins, isoforms). Bypassing the identification stage, you can significantly increase the amount of data for classification tasks. This makes it possible to successfully cluster the studied classes at the cost of information on molecular categorical predictors.

Keywords: cancer; neural network; system biology; bioinformatics; proteomics; metabolomics; multiomics data.

One of the machine learning methods that can solve classification problems on noisy data is the method of convolutional neural networks (CNN).

Purpose: creation of a neural network for the classification of patients with diseases similar in etiology and pathogenesis using the example of various oncophenotypes.

We conducted a proteo-metabolomic mass spectrometric study of patients with three types of cancer (ovarian, kidney and prostate cancer), of which two were classified as gender-specific, as well as conditionally healthy study participants. The obtained data were divided into two sets - for training and validation of the SNN, without prior identification. For the analysis and classification of pathologies, a neural network with the architecture of "residual convolutions" (1D-Residual CNN) was developed, the input data for which were directly the data of the mass spectrometric signal. A distinctive feature of deep convolutional neural networks is their ability to receive data in its original form and transform it into feature maps. In our implementation of the neural network, the data of the mass spectrometric signal in the MGF format were minimally transformed before being fed to the input of the neural network (noise normalization and filtering). For this network, the following pathology classification indicators were achieved: accuracy: 0.89 and recall: 0.87.

The trained neural network distinguishes with high reliability the types of oncopathologies among themselves, using metabolomic and proteomic spectra of patients' blood plasma at the input.

This work was financed by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of state support for the creation and development of World-Class Research Centers “Digital biodesign and personalized healthcare” No. 75-15-2020-913.

УДК 616-006:576.385.5 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-142-144

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ РАКА

Киямова Р. Г., Скрипова В.С., Булатова Л.Ф., Савенкова Д.С, Нургалиева А.К., Власенкова Р.А., Решетникова Д.Д., Тимонина А.А., Богданов М.В.

Казанский федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, Россия 420008, Казань, ул. Кремлевская 18
e-mail: kiyamova@mail.ru

С помощью технологий CRISPR/Cas9 и SEREX нами идентифицировано и охарактеризовано более двухсот потенциальных молекулярных маркеров онкологических заболеваний. Показано, что натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b является уникальной мишенью для разработки противоопухолевых таргетных препаратов благодаря его локализации и опухоль-специфическому эпитопу.

Ключевые слова: маркер, опухоль-ассоциированные антигены, рака яичника, рак поджелудочной железы, натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b.

Опухолевые биомаркеры — это молекулы, которые продуцируются опухолью или организмом хозяина и обеспечивают биологический материал для оценки риска возникновения злокачественной опухоли, диагностики опухолевых заболеваний, изучения молекулярных механизмов образования опухоли, дифференциальной диагностики и мониторинга заболевания, в том числе возникновения рецидивов. С пониманием молекулярной гетерогенности злокачественной опухоли стало понятно, что нет единого маркера для всех опухолей. Поэтому важен поиск новых молекулярных маркеров, уникальных для каждой опухоли для разработки на их основе эффективных таргетных препаратов, а также выявления панелей, сигнатур молекулярных маркеров, для разработки на их основе чувствительных и специфичных тест-систем для диагностики, мониторинга и прогноза онкологических заболеваний.

В нашей работе мы использовали высокопроизводительные технологии, включая технологию CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) для поиска молекулярных маркеров рака поджелудочной железы и технологию SEREX (serological analysis of cDNA expression library) для поиска молекулярных маркеров рака яичника, толстой кишки, молочной и щитовидной желез. С помощью скрининга опухолевых клеток поджелудочной железы линии Aspc-1, трансфицированных библиотеками гРНК, препаратами платины, было выявлено 130 генов – потенциальных регуляторов чувствительности к цисплатину и оксалиплатину при карциноме поджелудочной железы [1]. С помощью SEREX-скрининга фаговых экспрессирующих кДНК библиотек карцином яичника, толстой кишки и молочной и щитовидной желез, было

идентифицировано более 80 опухоль-ассоциированных антигенов, каждый из которых является потенциальным опухолевым маркером [2,3]. Создана сигнатура антигенов медуллярной карциномы молочной железы, которая дифференцирует больных и здоровых с чувствительностью 70% и специфичностью 91% [4].

С помощью SEREX-скрининга нам удалось идентифицировать молекулярную природу антигена MX35 как натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b [5]. Был проведен анализ его структуры и функции в опухолевых клетках рака яичника OVCAR4, а также особенности распознавания эпитопа MX35 в районе большого внеклеточного домена (ВКД) моноклональными антителами L2(20\3). Эти антитела распознают тот же эпитоп, что и терапевтические антитела XMT-1536 и XMT-1592, разработанные для лечения рака яичника и легкого. Показано, что конформация ВКД NaPi2b в опухолевых клетках меняется таким образом, что эпитоп MX35 становится более доступным для антител L2(20\3), что делает его потенциальным опухоль-специфическим эпитопом [6].

Полученные данные имеют как фундаментальную значимость, так и прикладную ценность, открывая большие перспективы для разработки новых, более специфичных противоопухолевых и диагностических препаратов.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета и поддержки Российского научного фонда (проект № 20-14-00166).

Литература

1. *Skripova V., Serebriiskii I., Abramova Z., Kiyamova R. CRISPR/Cas9 Technique for Identification of Genes Regulating Oxaliplatin Resistance of Pancreatic Cancer Cell Line // BioNanoScience. 2017. Vol.7(1). P. 97-100.*
2. *Kiyamova R. Kostianets O., Malyuchik S., Filonenko V., Usenko V., Gurtovyy V., Khozayenko Yu, Antonuk S., Old L., Gout I.// Identification of Tumor-Associated Antigens from Medullary Breast Carcinoma by a Modified SEREX Approach // Molecular Biotechnology. 2010. Vol.46(2). P. 105-112.*
3. *Kiyamova R., Garifulin O., Gryshkova V., Kostianets O., Shyian M., Gout I., Filonenko V. Preliminary study of thyroid and colon cancers-associated antigens and their cognate autoantibodies as potential cancer biomarkers. // Biomarkers. 2012. Vol.17. P. 362-371.*
4. *Kostianets O, Shyyan M, Antoniuk SV, Filonenko V, Kiyamova R. Panel of SEREX-defined antigens for breast cancer autoantibodies profile detection. // Biomarkers. 2017. Vol.22(2). P. 149-156.*
5. *Kiyamova, R. G.; Gryshkova, V. S.; Usenko, V. S.; Khozaenko, Y. S.; Gurtovyy, V. A.; Yin, B.; Ritter, G.; Old, L.; Gout, I. T.; Filonenko, V. Identification of phosphate transporter NaPi2b as MX35 cancer antigen by modified SEREX approach. // Biopolymers and cell. 2008. Vol.24(3). P. 218-224.*
6. *Minigulova L., Skripova V., Nurgalieva A.K., Ionova N., Reshetnikova D., Bogdanov M., Kiyamova R. Unusual folding of NaPi2b transporter extramembrane domain 4 during malignant transformation // Annals of Oncology. 2019. Vol.30.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-142-144

MOLECULAR MARKERS FOR CANCER DIAGNOSIS AND THERAPY

Kiyamova R.G., Skripova V.S., Bulatova L.F., Savenkova D.S., Nurgalieva A.K., Vlasenkova R.A., Reshetnikova D.D., Timonina A.A., Bogdanov M.V.

Kazan Federal University, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan, Russia
420008, Kazan, Kremlevskaya st.18
e-mail: kiyamova@mail.ru

Using CRISPR/Cas9 and SEREX technologies we have identified and characterized more than two hundred potential molecular markers of oncological diseases. It was shown that the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b is a unique target for the development of antitumor targeted drugs due to its localization and tumor-specific epitope.

Keywords: marker, tumor-associated antigens, ovarian cancer, pancreatic cancer, sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b.

Tumor biomarkers are the molecules that produced by the tumor or the host organism and provide biological material for assessing the risk of a malignant tumor, diagnosing tumor diseases, studying the molecular mechanisms

of tumor formation, differential diagnosis and monitoring of the disease, including the occurrence of metastasis. With the understanding of the molecular heterogeneity of malignant tumors, it became clear that there is no single marker for all tumors. Therefore, it is important to search for new molecular markers unique for each tumor to develop effective targeted drugs, as well as to identify panels, signatures of molecular markers, to develop sensitive and specific test systems for the diagnosis, monitoring and prognosis of oncological diseases.

In our work we used high-performance technologies, including CRISPR/Cas9 technology (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) to search for molecular markers of pancreatic cancer and SEREX (serological analysis of cDNA expression library) technology to search for molecular markers of ovarian, colon, breast and thyroid cancer. Screening of pancreatic tumor cell line Aspc-1 transfected with gRNA libraries by platinum preparations revealed 130 genes that are potential regulators of sensitivity to cisplatin and oxaliplatin in pancreatic carcinoma [1]. SEREX screening of phage-expressing cDNA libraries of ovarian, colon, breast, and thyroid carcinomas has identified more than 80 tumor-associated antigens, each of which is a potential tumor marker [2,3]. A signature of antigens of medullary breast carcinoma has been created, which differentiates patients and healthy ones with sensitivity of 70% and a specificity of 91% [4].

Using SEREX screening we were able to identify the molecular nature of the MX35 antigen as a sodium-dependent phosphate transporter of NaPi2b [5]. Its structure and function in ovarian OVCAR4 tumor cells were analyzed, as well as features of recognition of the MX35 epitope in the region of the large extracellular loop (ECL) by monoclonal antibodies L2(20\3). These antibodies recognize the same epitope as the therapeutic antibodies XMT-1536 and XMT-1592, developed for the treatment of ovarian and lung cancers. It has been shown that the conformation of NaPi2b ECL changes in tumor cells in such a way that the MX35 epitope becomes more accessible to L2(20\3) antibodies, which makes it a potential tumor-specific epitope [6].

The obtained data have both fundamental significance and applied value, opening up great prospects for the development of new, more specific antitumor drugs and diagnostic tools/

This paper has been supported by the Kazan Federal University Strategic Academic Leadership Program and by the Russian Science Foundation (project no. 20-14-00166).

References

1. *Skripova V., Serebriiskii I., Abramova Z., Kiyamova R. CRISPR/Cas9 Technique for Identification of Genes Regulating Oxaliplatin Resistance of Pancreatic Cancer Cell Line // BioNanoScience. 2017. Vol.7(1). P. 97-100.*
2. *Kiyamova R. Kostianets O., Malyuchik S., Filonenko V., Usenko V., Gurtovyy V., Khozayenko Yu, Antonuk S., Old L., Gout I.// Identification of Tumor-Associated Antigens from Medullary Breast Carcinoma by a Modified SEREX Approach // Molecular Biotechnology. 2010. Vol.46(2). P. 105-112.*
3. *Kiyamova R., Garifulin O., Gryshkova V., Kostianets O., Shyian M., Gout I., Filonenko V. Preliminary study of thyroid and colon cancers-associated antigens and their cognate autoantibodies as potential cancer biomarkers. // Biomarkers. 2012. Vol.17. P. 362-371.*
4. *Kostianets O, Shyyan M, Antoniuk SV, Filonenko V, Kiyamova R. Panel of SEREX-defined antigens for breast cancer autoantibodies profile detection. // Biomarkers. 2017. Vol.22(2). P. 149-156.*
5. *Kiyamova, R. G.; Gryshkova, V. S.; Usenko, V. S.; Khozaenko, Y. S.; Gurtovyy, V. A.; Yin, B.; Ritter, G.; Old, L.; Gout, I. T.; Filonenko, V. Identification of phosphate transporter NaPi2b as MX35 cancer antigen by modified SEREX approach. // Biopolymers and cell. 2008. Vol.24(3). P. 218-224.*
6. *Minigulova L., Skripova V., Nurgalieva A.K., Ionova N., Reshetnikova D., Bogdanov M., Kiyamova R. Unusual folding of NaPi2b transporter extramembrane domain 4 during malignant transformation // Annals of Oncology. 2019. Vol.30.*

УДК 577.15.08 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-144-147

ПОДХОДЫ К ПОВЫШЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭЛЕКТРОКАТАЛИЗА ЦИТОХРОМА P450 3A4

Королёва П.И., Шумянцева В.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Россия
119121, Россия, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8
email: 11126699@mail.ru

Разработана электрохимическая система на основе цитохрома P450 и рибофлавина, позволяющая увеличить выход продукта в модельной системе с использованием субстрата цитохрома P450 – эритромицина. Достигается увеличение каталитической активности цитохрома P450 на 28-36%.

Ключевые слова: цитохром P450 3A4, электрохимический анализ, эритромицин, рибофлавин.

Цитохром P450 3A4 (CYP3A4), изофермент обширного класса ферментов - монооксигеназ, катализирующий превращение большого количества субстратов, в том числе лекарственных веществ. Одним из преимуществ использования систем на основе цитохромов P450 как биокатализаторов для синтеза лекарственных веществ, является селективное превращение с сохранением необходимой конформации и отсутствие побочных продуктов. Эффективным подходом для воспроизведения каталитической активности цитохромов P450 является создание электрохимических систем, исключающих использование дополнительных белков – редокс партнеров. Подходом к увеличению каталитической активности цитохромов P450 является создание комплекса между ферментом и переносчиком электронов, например, рибофлавином (Rf).

На основе данных о каталитическом цикле цитохрома P450, первым этапом которого является связывание активного центра фермента и субстрата, был сделан вывод, о том, что предварительное взаимодействие субстрата и фермента будет способствовать увеличению каталитической активности цитохрома P450. В данной работе в качестве субстрата был выбран эритромицин (ЭР), подвергающийся N-деметилированию в системе с цитохромом P450 3A4. Также была разработана система, включающая рибофлавин в качестве медиатора переноса электронов.

На основе печатных графитовых электродов, модифицированных дидодецилдиметиламмоний бромидом, использованных ранее (ПГЭ/ДДАБ/цитохром P450 3A4) [1, 2] разработана система, позволяющая увеличить выход продукта цитохром P450 3A4-зависимой реакции N-деметилирования эритромицина. Каталитическую эффективность системы оценивали по количеству формальдегида спектрофотометрически. Результаты экспериментов представлены в таблице.

Таблица 1. Сравнительная каталитическая активность реакции N-деметилирования эритромицина в системе ПГЭ/ДДАБ/цитохром P450 3A4.

Электрод	Условия проведения электрокатализа, электролиз E=-0.50 В, 20 мин	Относительная активность, рассчитанная по концентрации выделившегося формальдегида
ПГЭ/ДДАБ/CYP3A4	+100 мкМ ЭР	100±2,4%
ПГЭ/ДДАБ/CYP3A4	+100 мкМ ЭР (30 минут преинкубация с субстратом)	128±3,2%
ПГЭ/ДДАБ/CYP3A4+ Rf (комплекс с Rf на электроде)	+100 мкМ ЭР (30 минут преинкубация с субстратом)	136±2,6%

По результатам, полученным в данном исследовании, можно сделать вывод, что моделирование стадий каталитического цикла цитохрома P450 на электродной поверхности приводит к повышению эффективности электрокатализа. Образование нековалентного комплекса рибофлавина и цитохрома P450 3A4 также способствует увеличению выхода продукта.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственной поддержки создания и развития Научных центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» № 75-15-2020-913.

Литературра

1. *Кузиков А.В. и др. Цитохром P450 3A4 как фермент биотрансформации лекарств: роль модификаций сенсорных систем в электрокатализе и электроанализе// Биомедицинская химия. 2020. Vol. 22. N. 1. P. 64-70.*
2. *Shumyantseva V. V. and others. All-electrochemical nanocomposite two-electrode setup for quantification of drugs and study of their electrocatalytical conversion by cytochromes P450 // Electrochimica Acta. 2020. Vol. 336. 135579*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-144-147

APPROACHES TO INCREASING THE EFFICIENCY OF THE ELECTROCATALYSIS OF CYTOCHROME P450 3A4

Koroleva P.I., Shumyantseva V.V.

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia
119121, Russia, Moscow, Pogodinskaya str, 10, building 8
email: 11126699@mail.ru

An electrochemical system based on cytochrome P450 and riboflavin has been developed, which makes it possible to increase the yield of the product in a model system using cytochrome P450 substrate - erythromycin. Achieved an increase in the catalytic activity of cytochrome P450 by 28-36%.

Key words: cytochrome P450 3A4, electrochemical analysis, erythromycin, riboflavin.

Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) is isozyme of wide class of enzymes – monooxygenases, catalyzing the transformation of a large number of substrates, including drugs. One of the advantages of using systems based on cytochrome P450 as biocatalysts for the synthesis of drugs is a selective transformation while maintaining of required conformation and the absence of by-products. An effective approach for reproducing the catalytic activity of cytochromes P450 is the creation of electrochemical systems that exclude the use of additional proteins - redox partners. An approach to increasing the catalytic activity of cytochromes P450 is the creation of a complex between the enzyme and an electron carrier, for example, riboflavin (Rf).

Based on the data on the catalytic cycle of cytochrome P450, the first stage of which is the binding of the active center of the enzyme and the substrate, it was concluded that the preliminary interaction of the substrate and the enzyme would increase the catalytic activity of cytochrome P450. In this work, erythromycin (ER), which undergoes N-demethylation in the system with cytochrome P450 3A4, was chosen as a substrate. A system, that includes riboflavin as an electron transport mediator, has also been developed.

Based on the graphite screen-printed electrodes modified with didodecyldimethylammonium bromide, used earlier (SPE / DDAB / cytochrome P450 3A4) [1, 2], a system that allows increasing the yield of the product of cytochrome P450 3A4-dependent reaction of N-demethylation of erythromycin has been developed. The catalytic efficiency of the system was assessed by the amount of formaldehyde spectrophotometrically. The experimental results are presented in the table.

Table 1. Comparative catalytic activity of the N-demethylation reaction of erythromycin in the PGE / DDAB / cytochrome P450 3A4 system.

Electrode	Conditions of conducting electrocatalysis, electrolysis E = -0.50 V, 20 min	Relative activity calculated from the concentration of released formaldehyde
SPE / DDAB / CYP3A4	+100 μM ER	100±2,4%
SPE / DDAB / CYP3A4	+100 μM ER (30 minutes pre-incubation with substrate)	128±3,2%
SPE / DDAB / CYP3A4+ Rf (complex with Rf at the electrode)	+100 μM ER (30 minutes pre-incubation with substrate)	136±2,6%

Based on the results obtained in this study, it can be concluded that modeling the stages of the catalytic cycle of cytochrome P450 on the electrode surface leads to an increase in the efficiency of electrocatalysis. The formation of a non-covalent complex of riboflavin and cytochrome P450 3A4 also contributes to an increase in the product yield.

This work was financed by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of state support for the creation and development of World-Class Research Centers “Digital biodesign and personalized healthcare” No. 75-15-2020-913.

References

1. *Kuzikov A.V. and others. Electroanalytical and electrocatalytical characteristics of cytochrome P450 3A4 using electrodes modified with nanocomposite carbon nanomaterials // Biomedical chemistry. 2020. Vol. 22. N. 1. P. 64-70.*

2. Shumyantseva V.V. and others. All-electrochemical nanocomposite two-electrode setup for quantification of drugs and study of their electrocatalytical conversion by cytochromes P450 // Electrochimica Acta. 2020. Vol. 336. 135579.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-147-148
УДК 616-006.66

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ПРОГРЕССИИ ОПУХОЛЕЙ КИШЕЧНИКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ КЛЕТОЧНОЙ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Лупатов А.Ю., Гисина А.М., Новикова С.Е., Ким Я.С., Сарыглар Р.Ю., Ярыгин К.Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва, Россия
119121 г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.
biocell@inbox.ru

Проведен анализ протеомных профилей стволовых и обычных раковых клеток, а также гематогенных и лимфогенных метастазов больных колоректальным раком. С использованием транскриптомного и биоинформатического анализа смоделированы предполагаемые пути регуляции экспрессии маркера стволовых клеток CD133. Исследованы микросателлитная нестабильность и потеря гетерозиготности в двух типах метастазов.

Ключевые слова: колоректальная аденокарцинома; раковые стволовые клетки; метастазирование; протеомный профиль; транскриптомный анализ; микросателлиты

С целью формирования омиксного профиля социально-значимых заболеваний были проведены протеомные, транскриптомные и генетические исследования колоректальной аденокарциномы. В сравнительном плане были изучены позитивные и негативные по маркеру раковых стволовых клеток (РСК) опухолевые клетки от 5 пациентов, а также синхронные метастазы, возникшие в результате лимфогенного или гематогенного метастазирования, от 8 пациентов. При профилировании с помощью LC-MS/MS выявлен целый ряд белков, преимущественно экспрессирующихся в CD133-позитивных РСК. На опухолевом материале от 30 пациентов, с помощью ИФА и проточной цитометрии, была проведена верификация четырех наиболее вероятных дифференциальных маркеров. В результате показано, что во всех образцах опухолевой ткани CD133 положительные клетки гораздо сильнее экспрессируют CEACAM5 (РЭА). S100A8, S100A9, DEFA1, также выявленные в качестве возможных дифференциальных маркеров РСК, показали повышенную экспрессию только в части проб опухолевой ткани. Нокаут CD133 в клеточных линиях колоректальной аденокарциномы HT-29 и CaCo-2 с использованием системы редактирования генома CRISPR-Cas9 не снизил экспрессию CEACAM5 в полученных клонах. Таким образом, CD133 с большой вероятностью является маркером, но не регулятором экспрессии CEACAM5.

Для выяснения функциональной роли молекулы CD133 и механизмов регуляции её экспрессии были проведены эксперименты in vitro, которые показали более высокую клоногенную и пролиферативную активности клеток HT-29 и CaCo-2, обладающих повышенной экспрессией CD133. Сравнительный полногеномный транскриптомный анализ CD133-позитивных и негативных клеток позволил сформировать список дифференциально экспрессирующихся генов для обеих клеточных линий. В результате применения биоинформационного ресурса «geneXplain» были сделаны предположения о потенциальных ключевых молекулярных регуляторах экспрессии CD133. Верификация регуляторов осуществляется в настоящее время с использованием CRISPR-Cas9 опосредованного редактирования генома.

Сравнительное исследование гематогенных и лимфогенных метастазов колоректальной аденокарциномы проводилось с использованием образцов опухолевой ткани, подвергнутых лазерной микродиссекции. Методом LC-MS/MS были идентифицированы 29 белков, которые различались по уровню экспрессии в гематогенных и лимфогенных метастазах более чем в 2 раза. Среди них белки, регулирующие клеточную миграцию и взаимодействие с клеточным микроокружением. Кроме того, аналогичные образцы, включая первичную опухоль и нормальную ткань, от 18 пациентов были исследованы на микросателлитную нестабильность и потерю гетерозиготности в отношении 27 микросателлитов. Не было обнаружено достоверных различий в паттернах делеций и нестабильности исследуемых маркеров в гематогенных и лимфогенных метастазах. В то же время, анализ распределения делеций у отдельных пациентов позволяет предположить, что гематогенное метастазирование может происходить, как непосредственно из первичного очага, так и опосредованно, через лимфогенные метастазы.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-147-148

STUDY OF THE MECHANISMS OF INTESTINAL TUMOR PROGRESSION USING THE CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY METHODS

Lupatov A.Yu., Gisina A.M., Novikova S.E., Kim Y.S., Saryglar R.Yu., Yarygin K.N.

Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute of Biomedical Chemistry named after V.N. Orekhovich", Moscow, Russia
119121 Moscow, Pogodinskaya st, 10/8.
biocell@inbox.ru

The analysis of proteomic profiles of stem and common cancer cells, as well as hematogenous and lymphogenous metastases of patients with colorectal cancer was carried out. Using transcriptome and bioinformatic analysis, the putative pathways of regulation of the CD133 stem cell marker expression were modeled. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in two types of metastases have been investigated.

Key words: colorectal adenocarcinoma; cancer stem cells; metastasis; proteomic profile; transcriptomic analysis; microsatellites

In order to form an omix profile of socially significant diseases, proteomic, transcriptomic and genetic studies of colorectal adenocarcinoma were carried out. The tumor cells positive or negative for the marker of cancer stem cells (CSC) isolated from 5 patients, as well as synchronous lymphogenous and hematogenous metastasis from 8 patients were studied. LC-MS/MS profiling revealed a number of proteins predominantly expressed in CD133-positive CSCs. The four most probable differential markers were verified on the tumor samples from 30 patients, using ELISA and flow cytometry. As a result, it was shown that in all tumor tissue samples the expression of CEACAM5 (CEA) is much higher in CD133 positive cells. S100A8, S100A9, and DEFA1, also identified as possible differential markers of CSCs, showed increased expression only in a portion of tumor tissue samples. CD133 knockout in HT-29 and CaCo-2 colorectal adenocarcinoma cell lines using the CRISPR-Cas9 genome editing did not reduce CEACAM5 expression in the resulting clones. Thus, CD133 is most likely a marker, but not a regulator of CEACAM5 expression.

To elucidate the functional role of the CD133 molecule and the mechanisms of regulation of its expression, in vitro experiments were carried out. They showed a higher clonogenic and proliferative activity of HT-29 and CaCo-2 cells with increased expression of CD133. Comparative genome-wide transcriptome analysis of CD133-positive and negative cells allowed to form a list of differentially expressed genes for both cell lines. Using the bioinformatics resource "geneXplain" molecular regulators of CD133 expression have been hypothesized. Regulators are currently being verified using CRISPR-Cas9 mediated genome editing. The regulators are currently being verified using CRISPR-Cas9 genome editing.

A comparative study of hematogenous and lymphogenous metastases of colorectal adenocarcinoma was carried out using samples of tumor tissue subjected to laser-capture microdissection. The LC-MS/MS identified 29 proteins that differed by more than 2 times in their expression level in hematogenous and lymphogenous metastases. Among them are proteins that regulate cell migration and interaction with the cellular microenvironment. In addition, the samples, including primary tumors and normal tissues, from 18 patients were examined for microsatellite instability and loss of heterozygosity for 27 microsatellite repeats. No significant differences were found in the patterns of deletions and instability of the markers under study in hematogenous and lymphogenous metastases. No significant differences in the deletions or microsatellite instability patterns were found in hematogenous and lymphogenous metastases. At the same time, analysis of the distribution of deletions in individual patients suggests that hematogenous metastasis can spread both directly from the primary lesion and indirectly through lymphogenous metastases.

УДК 577.15.08 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-149-150

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ – АБИРАТЕРОНА И ГАЛЕТЕРОНА – С ЦИТОХРОМОМ P450 51A1 (CYP51A1)

Масамрех Р.А.[1,2], **Кузиков А.В.**[1,2], **Веселовский А.В.**[2], **Торопыгин И.Ю.**[2], **Арчаков А.И.**[1,2], **Шумянцева В.В.**[1,2]

[1] *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1*
[2] *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ), Москва, Россия 119121, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8*
rami.masamreh@yandex.ru

Исследовано взаимодействие абиратерона и галетерона со стероид-метаболизирующим изоферментом цитохрома P450 (CYP51A1). Выявлено связывание по субстратному типу, что указывает на возможный метаболизм абиратерона и галетерона с помощью CYP51A1, однако электрокаталитическая реакция наблюдалась только в отношении абиратерона.

Ключевые слова: стероид-метаболизирующие ферменты, абиратерон, галетерон, электрокатализ

Абиратерон и галатерон – препараты, разработанные для лечения рака предстательной железы. В основе механизма действия данных препаратов лежит ингибирование ключевого фермента биосинтеза андрогенов – цитохрома P450 17A1 (CYP17A1). Абиратерон и галетерон являются производными стероидов, что позволяет предположить их взаимодействие с другими стероид-метаболизирующими изоферментами цитохрома P450. Цитохром P450 51A1 (CYP51A1) катализирует реакцию C14 деметилирования ланостерина с образованием 4,4-диметилхолеста-8(9), 14,24-триен-3β-ола. Несмотря на высокую вероятность взаимодействия лекарственных соединений, являющихся различными производными стероидов, с изоферментами цитохрома P450, участвующими в стероидогенезе, такого рода взаимодействия изучены недостаточно. Исследование взаимодействия ингибиторов CYP17A1 со стероид-метаболизирующими изоферментами цитохрома P450 важно с точки зрения рационализации их клинического применения, поскольку в результате таких взаимодействий может изменяться активность как изоферментов цитохрома P450 по отношению к природным субстратам, так и самого лекарственного соединения.

Методом дифференциальной спектроскопии было выявлено связывание абиратерона и галетерона с активным центром CYP51A1 по I (субстратному) типу. С помощью разработанной электрохимической системы на основе рекомбинантного CYP51A1, иммобилизованного на печатном графитовом электроде, модифицированного дидодецилдиметиламмония бромидом, был зафиксирован каталитический ток CYP51A1 при амперометрическом титровании ферментного электрода при фиксированном потенциале (-0.6 В отн. Ag/AgCl) абиратероном, однако при титровании галетероном амперометрический отклик не наблюдался. Продукт CYP51A1-зависимой электрокаталитической реакции по отношению к абиратерону был идентифицирован масс-спектрометрически ($\Delta m/z \approx +16$). Молекулярный докинг абиратерона и галетерона в активном центре CYP51A1 позволил выявить положения исследуемых соединений, при которых CYP51A1-зависимая монооксигеназная реакция по отношению к абиратерону более вероятна, чем по отношению к галетерону.

Полученные данные свидетельствуют о том, что абиратерон и галетерон могут выступать модуляторами активности CYP51A1. Кроме того, проведённые исследования указывают на субстратные свойства абиратерона, но не галетерона, по отношению к CYP51A1, что может влиять на фармакологическую активность абиратерона.

УДК 577.15.08 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-149-150

INTERACTIONS OF ANTICANCER DRUGS – ABIRATERONE AND GALETERONE – WITH CYTOCHROME P450 51A1 (CYP51A1)

Masamrekh R.A.[1,2], **Kuzikov A.V.**[1,2], **Veselovsky A.V.**[2], **Toropygin I.Yu.**[2], **Archakov A.I.**[1,2], **Shumyantseva V.V.**[1,2]

[1] *Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU)*
Ostrovitianov str. 1, Moscow, Russia, 117997
[2] *Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, Russia*
10, building 8, Pogodinskaya street, 119121, Moscow, Russia
rami.masamreh@yandex.ru

Interactions of abiraterone and galeterone with steroid-metabolizing cytochrome P450 (CYP51A1) was studied. Binding of substrate type was observed, which indicates possible metabolism of abiraterone and galeterone by CYP51A1, however electrocatalytic reaction only towards abiraterone was observed.

Key words: steroid-metabolizing enzymes, abiraterone, galeterone, electrocatalysis

Abiraterone and galeterone are drugs developed for prostate cancer treatment. Mechanism of action of these drugs is based on inhibition of the key enzyme of androgen biosynthesis – cytochrome P450 17A1 (CYP17A1). Abiraterone and galeterone are derivatives of steroids, what allows one to assume their interaction with other steroid-metabolizing cytochrome P450 isozymes. Cytochrome P450 51A1 (CYP51A1) catalyzes the reaction of C14 demethylation of lanosterol to yield 4,4-dimethylcholesta-8(9),14,24-triene-3β-ol. Despite high possibility of interactions of drugs, which are various derivatives of steroids, with cytochromes P450 isozymes involved in steroidogenesis, such interactions are studied not well enough. Studying interactions of CYP17A1 inhibitors with steroid-metabolizing cytochrome P450 isozymes is important for rationalizing of their clinical usage, because those interactions can result in changing both cytochrome P450 isozymes' activity towards their natural substrates and activity of the drug itself.

Type I (substrate) binding of abiraterone and galeterone with CYP51A1 active site was observed by means of differential spectroscopy. Catalytic current of CYP51A1 during amperometric titration of enzyme electrode at fixated potential (-0.6 V vs. Ag/AgCl) by abiraterone was registered with developed electrochemical system, based on recombinant CYP51A1 immobilized on screen-printed graphite electrode modified by didodecyldimethylammonium bromide, however amperometric response during titration by galeterone was not observed. The product of CYP51A1-dependent electrocatalytic reaction towards abiraterone was identified by mass-spectrometry ($\Delta m/z \approx +16$). Molecular docking of abiraterone and galeterone in active site of CYP51A1 revealed positions of the tested compounds, in which CYP51A1-dependent monooxygenase reaction towards abiraterone is more probable than towards galeterone.

The collected data indicates that abiraterone and galeterone can be modulators of CYP51A1's activity. Besides, the research taken shows substrate properties of abiraterone, but not galeterone, towards CYP51A1, which can influence on abiraterone's pharmacological activity.

УДК 577.126 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-150-153

РОЛЬ HH-СИГНАЛИНГА В ФИБРОГЕНЕЗЕ И ВОЗМОЖНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ ЕГО НА МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

Александрова А.А.[1,2], **Мехтиев А.Р.**[1], **В.А. Золотцев**[1],
Тимошенко О.С.[1], **Завьялова М.Г.**[1], **Санжаков М.А.**[1], **Щербаков К.А.**[1]

[1] *Институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича, 119121, Россия, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8;*
[2] *Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1*
Email: marif@yandex.ru

Hh-сигналинг является эмбриональным типом сигналинга, а также опухолевых клеток, и участвует в фиброгенезе. В данной работе предложены методы оценки и исследования Hh-сигналинга на модельных

системах с использованием ингибиторов и исследованием структуры Hh-лигандов в качестве онко- и профиброгенных маркеров.

Ключевые слова: Hh-сигналинг, фиброз печени, ингибиторы, Hh-лиганды, онкомаркеры

Целью данной работы явилась разработка метода детекции Sonic Hedgehog (SHh) лигандов в качестве маркеров фиброгенеза и онкогенеза у пациентов с фиброзом/циррозом печени (и другими патологиями), и способов фармакологического воздействия на их экспрессию и полиморфизм в модельных клеточных системах и ткани печени пациентов с хроническими заболеваниями печени вирусной и невирусной природы на различных стадиях фиброза и цирроза.

В рамках данного проекта будут предложены неинвазивные методы оценки стадии фиброза, прогностическая шкала для оценки риска прогрессирования фиброза печени и онкогенеза. Будут разработаны способы фармакологического воздействия на активированный Hh-сигналинг в модельных клеточных системах и ткани печени пациентов с хроническими заболеваниями печени.

Задачи проекта:

- определить диагностическую значимость сывороточных маркеров, участвующих в Hh-сигналинге и фиброгенезе, у пациентов с хроническими заболеваниями печени, фиброзом и циррозом печени вирусной и невирусной этиологии;
- разработать прогностическую шкалу для определения групп риска быстрого прогрессирования фиброза печени и развития гепатоцеллюлярной карциномы;
- разработать метод детекции при помощи масс-спектрометрического анализа Sonic Hedgehog(SHh) лигандов в модельных клеточных системах и ткани печени пациентов с хроническими диффузными заболеваниями печени, в т.ч. вирусными гепатитами B и C и неалкогольной жировой болезнью печени;
- исследовать влияние новых антагонистов Hh-сигналинга на активацию основных клеточных мишеней Smo, Ptch, Gli-зависимых генов, SuFu в модельных клеточных системах и ткани печени пациентов с хроническими вирусными и невирусными заболеваниями печени.

Sonic hedgehog (Shh) является морфогенным белком, участвующим в формировании широкого спектра тканей во время эмбриогенеза животных и при развитии опухолей. В процессе биосинтеза Shh и автокаталитической обработки, продуцируется липид-модифицированный аминоконцевой фрагмент белка (остаток 24-197 в человеческой последовательности), который отвечает за всю известную сигнализацию Hh и это очень консервативно эволюционно. Опубликованные биохимические исследования in vitro с использованием Shh дрозофилы определили, что молекула холестерина служит якорем в мембране, к которому прикреплен COOH-концевой фрагмент. Также были исследованны полноразмерный человеческий Sonic hedgehog, лиганды насекомых и млекопитающих, которые определялись масс-спектрометрически, что, в дополнение к холестерину, показало, что белок человеческого Shh является пальмитоилированным. Отображение пептидов и данные секвенирования указывают, что пальмитоильная группа присоединена на NH2 конце белка к α-аминогруппе Cys-24. Бесклеточные исследования пальмитоилирования показывают, что радиоактивная пальмитиновая кислота легко включается в дикий тип Sonic hedgehog, но не в варианте формы, лишенной сайт привязки Cys-24. Липид-модифицированные формы Shh показали примерно 30-кратное увеличение потенции над немодифицированным растворимым Shh в клетках (индукция щелочной фосфатазы C3H10T1 / 2), что свидетельствует о важной роли липидного фрагмента в функции Shh. Также показано, что внеклеточный белок, такой как Shh, также является пальмитоилированным [1-2]. Кроме того, Shh в препаратах модифицировался разнообразным количеством жирных кислот на его аминоконцевой части. Состав жирных кислот Shh влияет на его трафикинг на липидных рафтах, а также его активность. Результаты исследований показывают, что белки Hh существуют как семейство разнообразных белков, специфичных к липидам, которые могут быть изменены в различных физиологических и патологических условиях, чтобы регулировать различные свойства Hh белков [3].

В данном проекте, нашей задачей является разработка метода детекции различных форм Shh, что позволит исследовать возможные пути инактивации Hh-сигналинга с помощью новых ингибиторов. Коллектив, представляющий данный проект, имеет достаточно богатый опыт в создании и исследовании биологически активных соединений стероидной природы[4-6]. В рамках данного проекта созданы новые стероидные ингибиторы и производные циклопамина, свойства которых будут исследованы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственной поддержки создания и развития исследовательских центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» № 075-15-2020-913

Литература

1. *Renée I. Shapiro, Dingyi Wen, Melissa Levesque, Xiaoping Hronowski, Alan Gill, Ellen A.Garber, Alphonse Galdes, Kathryn L. Strauch, Frederick R.Taylor. Expression of Sonic hedgehog-Fc fusion protein in Pichia pastoris. Identification and control of post-translational, chemical, and proteolytic modifications. Protein Expression and Purification, 2003, 29(2), 272-283.*
2. *Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, Bixler SA, Ambrose CM, Garber EA, Miatkowski K, Taylor FR, Wang EA, Galdes A. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. J Biol Chem., 1998, 273(22), 14037-45.*
3. *Jun Long, Robert Tokhunts, William M. Old, Stephane Houel, Jezabel Rodgriguez-Blanco, Samer Singh, Neal Schilling, Anthony J.Capobianco, Natalie G.Ahn, David J.Robbins. Identification of a Family of Fatty-Acid-Speciated Sonic Hedgehog Proteins, Whose Members Display Differential Biological Properties. Cell Rep., 2015, 10 (8), 1280-1287.*
4. *Kostin Vladimir A., Zolottsev Vladimir A., Kuzikov Alexey V., Masamrekh Rami A., Shumyantseva Victoria V., Veselovsky Alexander V., Stulov Sergey V.,Novikov Roman A., Timofeev Vladimir P., Misharin Alexander Y. Oxazolinyl derivatives of [17(20)E]-21-norpregnene differing in the structure of A and B rings. Facile synthesis and inhibition of CYP17A1 catalytic activity, Steroids, 2016, 115, 114-122.*
5. *Stulov S.V., Dugin, N O., Zharkova, M S., Shcherbinin, D S., Kuzikov, A V., Shumantseva, V V., Misharin, A Y., Veselovsky, A V. Interaction of novel oxazoline derivatives of 17(20)E-pregna-5,17(20)-diene with cytochrome P450 17A1. Biochemistry, Supplemental Series B, 2015, 9 (2), 114-120.*
6. *Kuzikov A.V., Dugin N.O., Stulov S.V., Shcherbinin D.S., Zharkova M.S., Tkachev Y.V., Timofeev V.P., Veselovsky A.V., Shumyantseva V.V., Misharin A.Y.Novel oxazolinyl derivatives of pregna-5,17(20)-diene as 17α-hydroxylase/17,20-lyase (CYP17A1) inhibitors. Steroids, 2014, 88, 66-71.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-150-153

THE ROLE OF HH-SIGNALING IN FIBROGENESIS AND THE POSSIBILITY OF STUDYING IT ON MODEL SYSTEMS

Alexandrova A.A.[1,2], **Mekhtiev A.R.**[1], **V.A. Zolotsev**[1],
Timoshenko O.S.[1], **Zavyalova M.G.**[1], **Sanzhakov M.A.**[1], **Shcherbakov K. A.**[1]

[1] *V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, 119121, Russia, Moscow, st. Pogodinskaya, 10, bldg. 8;*
[2] *Russian National Research Medical University named after N.I.Pirogov, 117997, Moscow, st. Ostrovityanova, 1*
Email:marif@yandex.ru

Hh-signaling is an embryonic type of signaling as well as tumor cells, and is involved in fibrogenesis. This work proposes methods for assessing and studying Hh signaling on model systems using inhibitors and studying the structure of Hh ligands as onco- and profibrotic markers.

Key words: Hh-signaling, liver fibrosis, inhibitors, Hh-ligands, tumor markers

The aim of this work was to develop a method for the detection of Sonic Hedgehog (SHh) ligands as markers of fibrogenesis and oncogenesis in patients with liver fibrosis / cirrhosis (and other pathologies), and methods of pharmacological influence on their expression and polymorphism in model cell systems and liver tissue of patients with chronic liver diseases of a viral and non-viral nature at various stages of fibrosis and cirrhosis.

Within the framework of this project, non-invasive methods for assessing the stage of fibrosis, a prognostic scale for assessing the risk of progression of liver fibrosis and oncogenesis will be proposed. Methods of pharmacological action on activated Hh-signaling in model cell systems and liver tissue of patients with chronic liver diseases will be developed.

Project objectives:

- to determine the diagnostic significance of serum markers involved in Hh-signaling and fibrogenesis in patients with chronic liver diseases, fibrosis and cirrhosis of the liver of viral and non-viral etiology;
- to develop a prognostic scale to determine the risk groups for the rapid progression of liver fibrosis and the development of hepatocellular carcinoma;
- to develop a detection method using mass spectrometric analysis of Sonic Hedgehog (SHh) ligands in model cell systems and liver tissue of patients with chronic diffuse liver diseases, in incl. viral hepatitis B and C and non-alcoholic fatty liver disease;

- to study the effect of new antagonists of Hh-signaling on the activation of the main cellular targets Smo, Ptch, Gli-dependent genes, SuFu in model cell systems and liver tissue of patients with chronic viral and non-viral liver diseases.

Sonic hedgehog (Shh) is a morphogenic protein involved in the formation of a wide range of tissues during animal embryogenesis and in the development of tumors. During Shh biosynthesis and autocatalytic treatment, a lipid-modified amino-terminal protein fragment (residue 24-197 in the human sequence) is produced, which is responsible for all known Hh signaling and is very evolutionarily conservative. Published biochemical studies in vitro using Drosophila Shh have determined that the cholesterol molecule serves as an anchor in the membrane to which the COOH-terminal fragment is attached. The full-length human Sonic hedgehog, insect and mammalian ligands were also investigated, which were determined by mass spectrometry, which, in addition to cholesterol, showed that the human Shh protein is palmitoylated. Peptide imaging and sequencing data indicate that the palmitoyl group is attached at the NH2 end of the protein to the α-amino group of Cys-24. Cell-free palmitoylation studies indicate that radioactive palmitic acid is readily incorporated into the wild type Sonic hedgehog, but not into the form lacking the Cys-24 binding site. Lipid-modified forms of Shh showed an approximately 30-fold increase in potency over unmodified soluble Shh in cells (induction of alkaline phosphatase C3H10T1 / 2), which indicates an important role of the lipid fragment in the function of Shh. It has also been shown that an extracellular protein such as Shh is also palmitoylated [1-2]. In addition, Shh in the preparations was modified by various amounts of fatty acids at its amino terminal part. The Shh fatty acid composition influences its traffic on lipid rafts, as well as its activity. Research results indicate that Hh proteins exist as a family of diverse lipid-specific proteins that can be altered under different physiological and pathological conditions to regulate different properties of Hh proteins [3].

In this project, our task is to develop a method for detecting various forms of Shh, which will allow us to investigate possible ways of inactivation of Hh-signaling using new inhibitors. The team representing this project has quite a wealth of experience in the creation and research of biologically active compounds of steroid nature [4-6]. Within the framework of this project, new steroid inhibitors and cyclopamine derivatives have been created, the properties of which will be investigated.

This work was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of state support for the creation and development of world-class research centers "Digital Biodesign and Personalized Health Care" No. 075-15-2020-913.

References

1. *Renée I. Shapiro, Dingyi Wen, Melissa Levesque, Xiaoping Hronowski, Alan Gill, Ellen A.Garber, Alphonse Galdes, Kathryn L. Strauch, Frederick R.Taylor. Expression of Sonic hedgehog-Fc fusion protein in Pichia pastoris. Identification and control of post-translational, chemical, and proteolytic modifications. Protein Expression and Purification, 2003, 29(2), 272-283.*
2. *Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, Bixler SA, Ambrose CM, Garber EA, Miatkowski K, Taylor FR, Wang EA, Galdes A. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. J Biol Chem., 1998, 273(22), 14037-45.*
3. *Jun Long, Robert Tokhunts, William M. Old, Stephane Houel, Jezabel Rodgriguez-Blanco, Samer Singh, Neal Schilling, Anthony J.Capobianco, Natalie G.Ahn, David J.Robbins. Identification of a Family of Fatty-Acid-Speciated Sonic Hedgehog Proteins, Whose Members Display Differential Biological Properties. Cell Rep., 2015, 10 (8), 1280-1287.*
4. *Kostin Vladimir A., Zolottsev Vladimir A., Kuzikov Alexey V., Masamrekh Rami A., Shumyantseva Victoria V., Veselovsky Alexander V., Stulov Sergey V.,Novikov Roman A., Timofeev Vladimir P., Misharin Alexander Y. Oxazolinyl derivatives of [17(20)E]-21-norpregnene differing in the structure of A and B rings. Facile synthesis and inhibition of CYP17A1 catalytic activity, Steroids, 2016, 115, 114-122.*
5. *Stulov S.V., Dugin, N O., Zharkova, M S., Shcherbinin, D S., Kuzikov, A V., Shumantseva, V V., Misharin, A Y., Veselovsky, A V. Interaction of novel oxazoline derivatives of 17(20)E-pregna-5,17(20)-diene with cytochrome P450 17A1. Biochemistry, Supplemental Series B, 2015, 9 (2), 114-120.*
6. *Kuzikov A.V., Dugin N.O., Stulov S.V., Shcherbinin D.S., Zharkova M.S., Tkachev Y.V., Timofeev V.P., Veselovsky A.V., Shumyantseva V.V., Misharin A.Y. Novel oxazolinyl derivatives of pregna-5,17(20)-diene as 17α-hydroxylase/17,20-lyase (CYP17A1) inhibitors. Steroids, 2014, 88, 66-71.*

УДК 004.032.26 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-154-155

АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ ТЕЛЕМЕДИЦИНСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ДОГОСПИТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ПОДДЕРЖКИ ПРИНЯТИЯ ВРАЧЕБНЫХ РЕШЕНИЙ НА ОСНОВЕ МАШИННОЙ ОБРАБОТКИ И АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ НЕЙРОСЕТЕВОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Муранов А.Н.

Федеральное государственное автономное учреждение науки Институт конструкторско-технологической информатики Российской академии наук, Москва, Россия
127055, Москва, пер. Вадковский, 18, стр. 1а
e-mail: muranov@ikti.ru

Рассмотрены результаты разработки и особенности автоматизированной телемедицинской системы для проведения догоспитальной диагностики заболеваний и поддержки принятия врачебных решений на основе машинной обработки и анализа изображений с применением методов нейросетевого моделирования.

Ключевые слова: телемедицинская система, технологии искусственного интеллекта, цифровизация.

Дизайн предложенной ИКТИ РАН телемедицинской системы разработан на основе существующих медицинских информационный систем (МИС), при этом, совместно с врачами–консультантами он был существенно оптимизирован под конкретные задачи. Интерфейс системы создан в виде Web-сайта, что позволяет работать с системой удаленно на большинстве видов оборудования и операционных систем. Реализованное разделение прав пользователей позволяет максимально упростить интерфейс для каждой роли–врач/пациент/администратор и т.д. Семейство продуктов для генерации отчётов FastReport позволяет быстро и просто генерировать отчетную документацию. Интерфейс реализован с заложенным функционалом масштабирования или интеграцию в существующую МИС. Применены нейросетевые модели для диагностирования диабетической ретинопатии и фибрилляции предсердия. Реализован поиск пациента с фильтрацией, а анкета медицинских данных пациента позволяет получить доступ к исследованиям за короткое время. Оптимизированный блок исследования позволяет максимально быстро ввести данные пациента. Быстрый доступ к историческим данным прямо во время исследования позволяет оценить изменение состояния больного во времени и разных типов исследования, что помогает поставить наиболее точный диагноз.

На данном этапе реализации система имеет расширенный функционал по двум направлениям: кардиологии и офтальмологии. В качестве экспертных инструментов для работы с ЭКГ реализована встроенная в интерфейс системы линейка, которая помогает удобно и точно измерять интервалы на графике исследования, кроме того реализована возможность убрать из визуализации любое количество отведений, оставив только самые информативные. Полноэкранный режим и масштабирование позволяют подробно рассмотреть интересуемый временной интервал. Используемая в системе нейросетевая модель имеет точность определения фибрилляции предсердий (ФП) не менее 93%, а предиктивное исследование ФП обеспечивает точность не менее 87%.

Финансирование: Отдельные результаты работы были получены в рамках выполнения соглашения в форме субсидий из федерального бюджета Российской Федерации на государственную поддержку создания и развития научных центров мирового уровня, выполняющих научные исследования и разработки в рамках приоритетов научно-технического развития. (внутренний номер 00600/2020 / 56890) от 13 ноября 2020 г. № 075-15-2020-929.

UDC 004.032.26 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-154-155

AUTOMATED TELEMEDICAL SYSTEM FOR PRE-HOSPITAL DIAGNOSTICS OF DISEASES AND SUPPORT FOR MAKING DECISIONS BASED ON MACHINE PROCESSING AND ANALYSIS OF IMAGES WITH THE USE OF MOSETHETHINE

Muranov A.N.

Federal state autonomous scientific institution «Institute of Design and Technology Informatics of RAS», Moscow, Russia 127055, Moscow, Vadkovsky lane, 18, building 1a; e-mail: muranov@ikti.ru

The results of the development and features of an automated telemedicine system for pre-hospital diagnostics of diseases and support of medical decision-making based on machine processing and image analysis using neural network modeling methods are considered.

Keywords: telemedicine system, artificial intelligence technologies, digitalization.

The design of the telemedicine system proposed by IDTI RAS was developed on the basis of existing medical information systems (MIS), while, together with medical consultants, it was significantly optimized for specific tasks. The system interface is created in the form of a Web site, which allows you to work with the system remotely on most types of equipment and operating systems. The implemented separation of user rights allows to simplify as much as possible the interface for each role - doctor / patient / administrator, etc. The FastReport family of products for generating reports allows you to quickly and easily generate reporting documentation. The interface is implemented with built-in scaling functionality or integration into an existing MIS. Neural network models were used to diagnose diabetic retinopathy and atrial fibrillation. The search for a patient with filtering has been implemented, and the patient's medical data questionnaire allows access to examinations in a short time. The optimized exam unit allows for the fastest possible patient data entry. Quick access to historical data right during the study allows you to assess the change in the patient's condition over time and different types of research, which helps to make the most accurate diagnosis.

At this stage of implementation, the system has expanded functionality in two areas: cardiology and ophthalmology. As expert tools for working with ECG, a ruler built into the system interface is implemented, which helps to conveniently and accurately measure intervals on the study graph, in addition, it is possible to remove any number of leads from visualization, leaving only the most informative ones. Full screen mode and zooming allow you to see in detail the time interval of interest. The neural network model used in the system has an accuracy of atrial fibrillation (AF) determination of at least 93%, and predictive AF research provides an accuracy of at least 87%.

Funding: Some results of this work were obtained under the Grant Agreement in the form of subsidies from the federal budget of the Russian Federation for state support of establishment and development of world-class scientific centers performing scientific research and development under the priorities of scientific and technological development (internal number 00600/2020 / 56890) of November 13, 2020, No. 075-15-2020-929.

УДК 004.932.72 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-155-158

ТЕХНОЛОГИИ ИСКУСТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА ДЛЯ МОРФОЛОГИИ: ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Файзуллин А.Л., Иванова Е.И., Гринин В.О., Бакулина А.А., Тимашев П.С.

Центра «Цифрового биодизайна и персонализированного здравоохранения» Сеченовского университета, Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8
e-mail: fayzullin_a_l@staff.sechenov.ru

В данной работе была разработана программа на основе U-Net и VGG архитектур нейросетей для сегментации и анализа скан-изображений тканей почки и толстой кишки. Программа размечает до 12 классов анатомических структур в тканях, а также позволяет рассчитать предикторные гистологические биомаркеры для поддержки принятия решений врачом.

Ключевые слова: нейросетевые технологии, технологии Big Data, морфометрический анализ, анализ изображений, медицинские изображения.

Сверточные нейронные сети были применены для классификации изображений биопсий с онкологическими заболеваниями почек, толстой кишки и головного мозга. Обученный алгоритм достигал 96% точности, обеспечивая достоверную поддержку в принятии решения при диагностике типа опухоли онкопатологом. Одним из ключевых преимуществ применения машинного обучения в онкопатологии является интеграция разных типов данных. Нейросеть способна предсказывать выживаемость пациентов на основе анализа гистологического и генетического профилей опухоли.

Описанные выше алгоритмы направлены на повышение точности диагностики и прогноза лечения в рамках задач персонализированной медицины. Тем не менее, их возможности ограничены нехваткой репрезентативных баз скан-изображений гистологических препаратов (большая часть научных групп использует базу The Cancer Genome Atlas) и мета-данных. Низкое разрешение этих скан-изображений не позволяет исследовать такие патологические процессы как опухолевое микроокружение, внутриопухолевую гетерогенность и ядрышковую градацию. Статей по автоматической сегментации внутриопухолевых тканевых структур мало вне зависимости от типа области онкопатологии. Тем не менее именно подробная полуавтоматическая сегментация скан-изображения гистологического препарата позволит создать прикладное программное обеспечение для врачей, ориентированное на коррекцию тактики лечения.

Применение гистологических биомаркеров в коррекции стратегии лечения пациентов является одним из важнейших направлений персонализированной медицины. Так, было показано, что автоматизированный подход к оценке взаимоотношений опухолевого и стромального компонента имеет прогностическую ценность для раков молочной железы и толстой кишки. Глубинный анализ опухолевого микроокружения был проведен в 3D реконструированной микроскопической модели поджелудочной железы. Подобный подход в нейропатологии реализуем, но недостаточен, так как не отразит особенности внутриопухолевой гетерогенности. Поэтому мы совместили известные подходы для анализа гистологических препаратов с алгоритмами для цитологического анализа, которые зарекомендовали себя в практике.

Научные группы, которые развивают применение машинного обучения для определения гистологических биомаркеров, во всем мире сталкиваются с общими ограничениями – нехваткой эффективных инструментов и базы данных для совершенствования программного обеспечения. Поэтому центрами развития компьютеризированной патологии становятся небольшие инновационные компании. К самым перспективным иностранным группам можно отнести лабораторию Kimia в Университете Ватерлоо (Канада) и компанию «SpIntellx», основанную профессором и патологоанатомом М. Бечичем из Университета Питтсбурга (США). В России важнейшими центрами инноваций становятся компания «ЮНИМ» и крупные корпорации, такие как «Сбер», «МТС» и «Билайн».

В рамках научных задач Биобанка Научного центра мирового уровня “Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение” сотрудниками Сеченовского Университета была разработана программа для сегментации и анализа медицинских изображений. Научная группа включала сотрудников с компетенциями в сферах онкопатологии, цифровой патологии, а также машинного обучения для реализации данного научного проекта. Решение поставленной научной задачи было осуществлено командой исследователей, включавшей в себя специалистов по вопросам морфологии, гистологической диагностики и молекулярных особенностей опухолей почек, толстой кишки и головного мозга, а также в области цифровой патогистологической диагностики и создания систем нейросетевого анализа и обработки больших массивов научных данных. Базисом для успешной реализации проекта послужила слаженная работа коллектива по методологически сходной проблематике в сфере создания новых диагностических подходов в цифровой патологии. Конечным итогом проекта станет новый морфометрический инструмент для «глубокой» аннотации и анализа гистологических биомаркеров.

Литература

1. *Kather J. N. et al. Predicting survival from colorectal cancer histology slides using deep learning: A retrospective multicenter study //PLoS medicine. – 2019. – Т. 16. – №. 1. – С. e1002730.*
2. *Zeng Z. et al. RIC-Unet: An improved neural network based on Unet for nuclei segmentation in histology images //Ieee Access. – 2019. – Т. 7. – С. 21420-21428.*
3. *Hermsen M. et al. Deep learning–based histopathologic assessment of kidney tissue //Journal of the American Society of Nephrology. – 2019. – Т. 30. – №. 10. – С. 1968-1979.*
4. *Uchino E. et al. Classification of glomerular pathological findings using deep learning and nephrologist–AI collective intelligence approach //International Journal of Medical Informatics. – 2020. – Т. 141. – С. 104231.*
5. *Bouteldja N. et al. Deep learning–based segmentation and quantification in experimental kidney histopathology // Journal of the American Society of Nephrology. – 2021. – Т. 32. – №. 1. – С. 52-68.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-155-158

ARTIFICIAL INTELLIGENCE TECHNOLOGIES FOR MORPHOLOGY: OPPORTUNITIES AND PROSPECTS

Fayzullin A.L., Ivanova E.I., Grinin V.O., Bakulina A.A., Timashev P.S.

World-Class Research Centers "Digital biodesign and personalized healthcare", Sechenov University, Moscow, Russia 119991, Moscow, Trubetskaya st., 8
e-mail: fayzullin_a_l@staff.sechenov.ru

In this work, a program was developed based on U-Net and VGG neural network architectures for segmentation and analysis of scan images of kidney and colon tissues. The program maps up to 12 classes of anatomical structures in tissues, and also allows the calculation of predictive histological biomarkers to support physician decision-making.

Keywords: neural network technologies, Big Data technologies, morphometric analysis, image analysis, medical images.

Convolutional neural networks have been used to classify biopsy images with cancers of the kidney, colon, and brain. The trained algorithm achieved 96% accuracy, providing reliable decision support in the diagnosis of tumor type by an oncopathologist. One of the key advantages of using machine learning in oncopathology is the integration of different types of data. The neural network is able to predict patient survival based on the analysis of the histological and genetic profiles of the tumor.

The algorithms described above are aimed at improving the accuracy of diagnosis and prognosis of treatment within the framework of the tasks of personalized medicine. However, their capabilities are limited by the lack of representative databases of scanned images of histological preparations (most of the scientific groups use The Cancer Genome Atlas database) and metadata. The low resolution of these scan images does not allow studying such pathological processes as the tumor microenvironment, intratumoral heterogeneity, and nucleolar gradation. There are few articles on automatic segmentation of intratumoral tissue structures, regardless of the type of area of oncopathology. Nevertheless, it is the detailed semi-automatic segmentation of the scanned image of a histological specimen that will make it possible to create applied software for doctors focused on correcting treatment tactics.

The use of histological biomarkers in the correction of patient treatment strategies is one of the most important areas of personalized medicine. Thus, it was shown that an automated approach to assessing the relationship of the tumor and stromal component has predictive value for breast and colon cancers. An in-depth analysis of the tumor microenvironment was performed in a 3D reconstructed microscopic model of the pancreas. A similar approach in neuropathology is feasible, but insufficient, since it does not reflect the features of intratumoral heterogeneity. Therefore, we have combined well-known approaches for the analysis of histological preparations with algorithms for cytological analysis, which have proven themselves in practice.

Research groups that are developing the application of machine learning to identify histological biomarkers around the world face common constraints - a lack of effective tools and a database to improve software. Therefore, small innovative companies are becoming centers for the development of computerized pathology. The most promising foreign groups include the Kimia laboratory at the University of Waterloo (Canada) and the SpIntellx company founded by professor and pathologist M. Becic from the University of Pittsburgh (USA). In Russia, UNIM and large corporations such as Sberbank, MTS and Beeline are becoming the most important centers of innovation.

Within the framework of the scientific tasks of the Biobank of the World-class Scientific Center "Digital Biodesign and Personalized Health Care", the staff of the Sechenov University developed a program for the segmentation and analysis of medical images. The scientific group included employees with competencies in the fields of oncopathology, digital pathology, and machine learning for the implementation of this scientific project. The solution to this scientific problem was carried out by a team of researchers, which included specialists in morphology, histological diagnostics and molecular features of kidney, colon and brain tumors, as well as in the field of digital pathological diagnostics and the creation of neural network analysis systems and processing large amounts of scientific data. The basis for the successful implementation of the project was the well-coordinated work of the team on methodologically similar problems in the field of creating new diagnostic approaches in digital pathology. The end result of the project will be a new morphometric tool for "deep" annotation and analysis of histological biomarkers.

References

1. *Kather J. N. et al. Predicting survival from colorectal cancer histology slides using deep learning: A retrospective multicenter study //PLoS medicine. – 2019. – V. 16. – №. 1. – P. e1002730.*
2. *Zeng Z. et al. RIC-Unet: An improved neural network based on Unet for nuclei segmentation in histology images //Ieee Access. – 2019. – V. 7. – P. 21420-21428.*
3. *Hermsen M. et al. Deep learning–based histopathologic assessment of kidney tissue //Journal of the American Society of Nephrology. – 2019. – V. 30. – №. 10. – P. 1968-1979.*
4. *Uchino E. et al. Classification of glomerular pathological findings using deep learning and nephrologist–AI collective intelligence approach //International Journal of Medical Informatics. – 2020. – V. 141. – P. 104231.*
5. *Bouteldja N. et al. Deep learning–based segmentation and quantification in experimental kidney histopathology // Journal of the American Society of Nephrology. – 2021. – V. 32. – №. 1. – P. 52-68.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-158-159

ВОЗМОЖНОСТИ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА В ДИСТАНЦИОННОЙ ОЦЕНКЕ ПАРАМЕТРОВ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

Сагирова Ж.[1]**, Кузнецова Н.**[2]**, Захаров И.**[1]**, Суворов А.**[3]**, Ларионов В.**[4]**, Чомахидзе П.**[1]**, Копылов Ф.**[1,2]

1 - Научно-исследовательский центр "Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение", Первый Московский государственный медицинский университет им.И. М. Сеченова, Москва RU, hmc.sechenov@gmail.com
2 - Кафедра кардиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики Института клинической медицины им. Н. В. Склифосовского, Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова. Москва RU
3 - Центр анализа сложных систем, Научный центр "Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение", Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва RU, 4 ООО "КардиоКВАРК", Москва, RU

При использовании одноканального ЭКГ и ФПГ удалось с высокой точностью оценить систолическую и диастолическую дисфункцию левого желудочка различной степени

Ключевые слова: электрокардиограмма, пульсовая волна, дисфункция миокарда, эхокардиография

Нашей целью было диагностировать наличие систолической и/или диастолической дисфункции левого желудочка (ЛЖ) с помощью анализа ЭКГ и фотоплетизмографии (ФПГ) с применением методов искусственного интеллекта. Мы включили 600 пациентов (в возрасте 57±12,1 года) с систолической и/или диастолической дисфункцией (СД или ДД) ЛЖ и без нее, проанализированных с помощью комплексного протокола эхокардиографии. Выполнялась синхронная запись одноканальной ЭКГ и пульсовой волны методом фотоплетизмографии. Проведен временной и спектральный анализ ЭКГ с непрерывным вейвлет-преобразованием (преобразованием Фурье). Более 1000 параметров ЭКГ и пульсовой волны были сопоставлены с параметрами эхокардиографии. На основе машинного обучения разработан математический алгоритм выявления систолической и диастолической дисфункции миокарда. Была показана следующая диагностическая точность алгоритма в определении систолической и диастолической функции миокарда: Чувствительность 78,4%, Специфичность 77,2% (AUC 0,84) для систолической дисфункции и Чувствительность 85,5% и специфичность 75,6% (AUC 0,86) для диастолической дисфункции левого желудочка. Следовательно, при использовании одноканального ЭКГ и ФПГ удалось с высокой точностью оценить систолическую и диастолическую дисфункцию левого желудочка различной степени.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-158-159

THE POSSIBILITIES OF ARTIFICIAL INTELLIGENCE IN THE REMOTE ASSESSMENT OF THE PARAMETERS OF THE CARDIOVASCULAR SYSTEM

Sagirova Zh.[1], Kuznetsova N.[2], Zakharov I.[1], Suvorov A.[3], Larionov V.[4], Chomakhidze P.[1], Kopylov Ph.[1,2]

1 - Research Center "Digital Biodesign and Personalized Healthcare", I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow EN. hmc.sechenov@gmail.com
2 - Department of Cardiology, Functional and Ultrasound Diagnostics of the N. V. Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University. Moscow RU
3 - Center for Analysis of Complex Systems, Research Center "Digital Biodesign and Personalized Healthcare", I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow RU, 4 LLC "CardioKVARK", Moscow, RU

When using a single-channel ECG and FPG, it was possible to assess systolic and diastolic dysfunction of the left ventricle of various degrees with high accuracy

Keywords: electrocardiogram, pulse wave, myocardial dysfunction, echocardiography

Our objective was to diagnose the presence of systolic and / or diastolic dysfunction of the left ventricle (LV) using ECG analysis and photoplethysmography (FPG) using artificial intelligence methods. We included 600 patients (aged 57±12.1 years) with and without LV systolic and/or diastolic dysfunction (DM or DD), analyzed using a comprehensive echocardiography protocol. Synchronous recording of a single-channel ECG and pulse wave was performed by photoplethysmography. The time and spectral analysis of the ECG with a continuous wavelet transform (Fourier transform) is carried out. More than 1000 parameters of the ECG and pulse wave were compared with the parameters of echocardiography. Based on machine learning, a mathematical algorithm for detecting systolic and diastolic myocardial dysfunction has been developed. The following diagnostic accuracy of the algorithm in determining systolic and diastolic myocardial function was shown: Sensitivity of 78.4%, Specificity of 77.2% (AUC 0.84) for systolic dysfunction and Sensitivity of 85.5% and specificity of 75.6% (AUC 0.86) for left ventricular diastolic dysfunction. When using a single-channel ECG and FPG, it was possible to assess systolic and diastolic dysfunction of the left ventricle of various degrees with high accuracy.

БИОФАРМА

BIOPHARMACEUTICS

БИОТЕХНОЛОГИЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ТЕРАПИИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ. ВАКЦИНЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ, ВНЕДРЕНИЕ В ПРАКТИКУ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

BIOTECHNOLOGY FOR INFECTIOUS DISEASE PREVENTION AND TREATMENT. NEW GENERATION VACCINES, PRACTICAL APPLICATION IN HEALTH CARE

1. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ЛАНТИБИОТИКОВ
С ПОМОЩЬЮ ФЕРМЕНТОВ ИЗ BACILLUS LICHENIFORMIS, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ
ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ ЛИХЕНИЦИДИНА
Антошина Д.В., Овчинникова Т.В., Баландин С.В. 162

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF LANTIBIOTICS
USING LICHENICIDIN-MODIFYING ENZYMES FROM BACILLUS LICHENIFORMIS
Antoshina D.V., Ovchinnikova T.V., Balandin S.V. 163

2. СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ОЧИСТКИ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВЕКТОРОВ
Кочина Е.А., Михайлюк Е.А., Глазкова Д.В., Богословская Е.В. 163

EVALUATION OF VIRAL PARTICLES YIELD AT DIFFERENT STAGES
OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS PURIFICATION
Kochina E.A., Mikhailyuk E.A., Glazkova D.V., Bogoslovskaya E.V. 165

3. РАЗРАБОТКА И ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ «BETUVAX-COV-2» ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ COVID-19
Красильников И.В., Кудрявцев А.В. Крючков Н.Н., Исаев А.А. 166

DEVELOPMENT AND PRE-CLINICAL STUDIES
OF THE RECOMBINANT VACCINE "BETUVAX-COV-2" FOR PREVENTION OF COVID-19
Krasilnikov I.V., Kudryavtsev A.V. Kryuchkov N.N., Isaev A.A. 168

4. ОЦЕНКА ИММУНОКОРРЕГИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА Phallus impudicuS
ПО ИЗМЕНЕНИЮ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНОВ ЖИВОТНЫХ
Разин А.Н., Волков М.Ю. 169

EVALUATION OF THE IMMUNOCORRECTIVE EFFECT OF VESELKA
ON CHANGES IN IMMUNOCOMPETENT ORGANS OF ANIMALS
Razin A. N., Volkov M. Yu. 170

5. АНТИБИОПЛЕНОЧНАЯ АКТИВНОСТЬ β-ШПИЛЕЧНЫХ
АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ МОРСКИХ ПОЛИХЕТ
Сафронова В.Н., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В. 171

ANTIBIOFILM ACTIVITY OF β-HAIPRIN ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM MARINE POLYCHAETA
V.N. Safronova, P.V. Panteleev, T.V. Ovchinnikova 172

6. НОВОЕ СЕМЕЙСТВО ПРОЛИН-БОГАТЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ,
ИНГИБИРУЮЩИХ ТРАНСЛЯЦИЮ У БАКТЕРИЙ
Сафронова В.Н., Кругликов Р.Н., Овчинникова Т.В., Пантелеев П.В. 173

NOVEL FAMILY OF PROLINE-RICH ANTIMICROBIAL PEPTIDES
INHIBITING BACTERIAL TRANSLATION V.N.
Safronova, R.N. Kruglikov, T.V. Ovchinnikova, P.V. Panteleev 174

7. ИНДУКЦИЯ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА
РЕКОМБИНАНТНЫМ ШТАММОМ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ,
ЭКСПРЕССИРУЮЩИМ КАССЕТУ ГЕНОВ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА МАРБУРГ
Семенова А.В., Гражданцева А.А., Антонец Д.В., Карпенко Л.И.,
Старостина Е.В., Боргоякова М.Б., Кочнева Г.В. 174

INDUCTION OF T-CELL IMMUNE RESPONSE
BY A RECOMBINANT STRAIN OF VACCINIA VIRUS EXPRESSING
A CASSETTE OF STRUCTURAL PROTEIN'S GENES OF MARBURG VIRUS
Semenova A.V., Grazhdantseva A.A., Antonets D.V., Karpenko L.I.,
Starostina E.V., Borgoyakova M.B., Kochneva G.V. 175

УДК 615.331 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-162-163

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ЛАНТИБИОТИКОВ С ПОМОЩЬЮ ФЕРМЕНТОВ ИЗ BACILLUS LICHENIFORMIS, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ ЛИХЕНИЦИДИНА

Антошина Д.В., Овчинникова Т.В., Баландин С.В.

Государственный научный центр «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», Москва, Россия
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10
e-mail: riruka11@mail.ru

В работе исследована возможность использования ферментов, осуществляющих посттрансляционные модификации лантибиотика лихеницидина, для биотехнологического получения других антимикробных пептидов класса лантибиотиков.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, антимикробные пептиды, бактериоцины, лантибиотики.

В настоящее время остро стоит проблема борьбы с антибиотикорезистентными бактериальными инфекциями, в особенности мультирезистентными. Одним из перспективных подходов к решению данной проблемы является поиск, изучение и биотехнологическое получение рибосомально синтезируемых антимикробных пептидов бактериального происхождения (бактериоцинов). Особый интерес для медицины представляют бактериоцины класса лантибиотиков, имеющие низкую токсичность для человека и высокую активность в отношении клинически значимых грамположительных и грамотрицательных бактериальных инфекций. Лантибиотики содержат в своей структуре внутримолекулярные тиоэфирные связи, которые образуются в процессе посттрансляционной ферментативной дегидратации остатков Ser/Thr и последующей циклизации при их взаимодействии с остатками Cys. Исследование субстратной специфичности ферментов биосинтеза лантибиотиков открывает путь к их использованию для получения рекомбинантных аналогов природных лантибиотиков и других биологически активных лантипептидов, имеющих важное медицинское значение.

В данной работе мы исследовали возможность применения ферментов LchM1 и LchM2, модифицирующих двухкомпонентный лантибиотик лихеницидин из *Bacillus licheniformis* B-511, для биотехнологического получения ряда других лантибиотиков классов 1 и 2. Получение и модификацию пептидов осуществляли с помощью гетерологической коэкспрессии генов лантибиотиков и генов ферментов LchM1 или LchM2 в клетках *E. coli* BL21 (DE3) под контролем T7 промотора. Фермент LchM2 проявил высокую активность при модификации его природного субстрата лихеницидина β. Показано, что фермент LchM2 способен эффективно проводить дегидратацию предшественников ряда лантибиотиков класса 2, включая двухкомпонентный халодурацин из *Bacillus halodurans* C-125 и однокомпонентные лантибиотики нукацин ISK-1 из *Staphylococcus warneri* ISK-1, стрептококцин A-FF22 из *Streptococcus pyogenes* FF22 и саливарицин A из *Streptococcus salivarius* 20P3. Обнаружена более низкая активность фермента LchM2 при модификации лантибиотика субтилина из *Bacillus subtilis* ATCC 6633, относящего к классу 1 и имеющего высокую степень гомологии с низином. Низкий уровень выхода модифицированного продукта, которую продемонстрировал фермент LchM1 в гетерологической системе, в том числе, и при модификации своего природного субстрата лихеницидина α, не позволяет в настоящее время делать выводы о субстратной специфичности данного фермента. Полученные результаты показывают принципиальную возможность использования ферментов, осуществляющих посттрансляционные модификации лантибиотиков, для получения рекомбинантных аналогов их природных субстратов, а также пептидов со схожей структурой или принадлежащих к тому же классу.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00369 А.

UDC 615.331 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-162-163

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF LANTIBIOTICS USING LICHENICIDIN-MODIFYING ENZYMES FROM BACILLUS LICHENIFORMIS

Antoshina D.V., Ovchinnikova T.V., Balandin S.V.

M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow 117997, Russia, Moscow, Ul. Miklukho-Maklaya, 16/10
e-mail: riruka11@mail.ru

In this work we investigated the possibility of using the lantibiotic lichenicidin- modifying enzymes for the biotechnological production of other antimicrobial peptides of the lantibiotic class.

Keywords: antibiotic resistance, antimicrobial peptides, bacteriocins, lantibiotics.

Currently, there is an acute problem of combating antibiotic-resistant bacterial infections, especially multidrug-resistant ones. One of promising approaches to solve this problem is the search, study and biotechnological production of ribosomally synthesized antimicrobial peptides of bacterial origin (bacteriocins). Of particular interest for medicine are bacteriocins of the lantibiotic class, which have low toxicity to humans and high activity against clinically relevant gram-positive and gram-negative bacterial infections. Lantibiotics contain intramolecular thioether bonds in their structure, which are formed during post-translational enzymatic dehydration of Ser/Thr residues and subsequent cyclization when interacting with Cys residues. The study of the substrate specificity of the enzymes participating in biosynthesis of lantibiotics opens the way to their use for the production of recombinant analogs of natural lantibiotics and other biologically active lanthipeptides that are of great medical importance.

In this work, we investigated the usability of the enzymes LchM1 и LchM2, which modify the two-component lantibiotic lichenicidin from *Bacillus licheniformis* B-511, for the biotechnological production of a number of other lantibiotics of classes 1 and 2. Preparation and modification of the peptides was carried out using heterologous co-expression of lantibiotics genes and the LchM1 or LchM2 enzymes genes in *E. coli* BL21 (DE3) cells under the control of the T7 promoter. The LchM2 enzyme showed a high activity in the process of modification of its natural substrate lichenicidin β. It was shown that the LchM2 enzyme is capable of efficiently dehydrating a number of class 2 lantibiotics, including two-component haloduracin from *Bacillus halodurans* C-125, and one-component lantibiotics nukacin ISK-1 from *Staphylococcus warner*i ISK-1, streptococcin A-F22 from *Streptococcus pyogenes* FF22, and salivaricin A from *Streptococcus salivarius* 20P3. A lower activity of the LchM2 enzyme was found upon modification of the lantibiotic subtilin from *Bacillus subtilis* ATCC 6633, which belongs to class 1 and has a high homology with nisin. The low level of the modified product yield, which was demonstrated by the LchM1 enzyme in the heterologous system, including the modification of its natural substrate lichenicidin α, does not currently allow drawing conclusions about the substrate specificity of this enzyme. The results obtained show the fundamental possibility of using lantibitic-modifying enzymes to obtain recombinant analogs of their natural substrates, as well as peptides of a similar structure or of the same class.

The work was supported by RFBR, the project number 20-015-00369.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-163-166
УДК 57.083.224

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ОЧИСТКИ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВЕКТОРОВ

Кочина Е.А., Михайлюк Е.А., Глазкова Д.В., Богословская Е.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства
119121, Москва, Погодинская д. 10с1
e-mail: evgeniakochina@gmail.com

Представлены результаты по сравнению двух методов очистки аденоассоциированного вектора: ультрацентрифугирования в градиенте йодиксанола и двухстадийной очистки раствором полиэтиленгликоля.

Ключевые слова: аденоассоциированный вектор, генная терапия, ультрацентрифугирование, инфекционный титр

Использование аденоассоциированных векторов (AAB) является перспективным направлением генной терапии. Одним из этапов проверки эффективности генотерапевтического препарата является проведение экспериментов на модельных животных. На этом этапе требуется большое количество очищенного рекомбинантного вируса. Наиболее распространенным методом очистки является ультрацентрифугирование (УЦ) в градиенте йодиксанола, однако двухстадийная очистка растворами полиэтиленгликоля (PEG8000) является более доступным методом. Целью данной работы было сравнить два вышеуказанных метода очистки.

Наработку *AAB* проводили на клетках HEK293FT в культуральных флаконах площадью 150 см^2 методом транзиентной трансфекции. Ростовую среду сливали в отдельную бутыль, биомассу клеток снимали и осаждали центрифугированием, клетки лизировали. Клеточный лизат осветляли (обрабатывали нуклеазой и пропускали через 0,45 мкм фильтр). Осветленный лизат, смешивали со средой, очищали либо УЦ в градиенте йодиксанола с последующим диализом [1], либо двухфазной очисткой с помощью PEG8000, либо комбинацией обоих вариантов. Очистку с помощью PEG8000 проводили по стандартному протоколу [2]. Первая стадия включала в себя осаждение в 40% PEG8000/2,5M NaCl, ресуспендирование в HEPES-буфере. Вторая стадия – экстракцию AAV хлороформом, разделение вирусных частиц в смеси PEG8000/сульфат аммония (10%/13,5%) и диализ на Amicon Ultra-15 100K MWCO. В комбинированных вариантах вирус сначала проходил I или I и II стадию очистки с помощью PEG8000, а затем очищался в градиенте йодиксанола. После каждого этапа оценивали выход вирусных частиц с помощью ПЦР-титра по матрице ITR и инфекционному титру на клетках HT1080.

Анализ показал, что 15% вирусных частиц находилось в среде, 83,51% в неосветленном лизате (Табл. 2). Выход вирусных частиц после очистки методом УЦ составил 14,4% при очистке только из лизата и 12,5% при очистке из лизата и среды, выход после очистки растворами полиэтиленгликоля составил 3,4% (Табл. 1). В результате комбинированной очистки терялось много вирусных частиц, что делает нецелесообразным ее применение. Разница между ПЦР-титром и инфекционным титром до очистки составляет 4 порядка, на промежуточных этапах очистки – 3 порядка. Это связано с тем, что до очистки в среде и лизате находится большое количество остаточной ДНК, которая детектируется при измерении ПЦР-титра. Инфекционный титр вируса после очистки методом УЦ выше на порядок, чем титр вируса после очистки полиэтиленгликолем, в то время как их ПЦР-титры примерно равны. Таким образом, вирус после очистки в градиенте йодиксанола чище, чем после очистки в растворах полиэтиеленгликоля.

В данной работе проведено сравнение двух вариантов очистки: в градиенте йодиксанола и методом двухстадийной очистки раствором полиэтиленгликоля. Несмотря на кажущуюся простоту, многостадийность метода очистки растворами полиэтиленгликоля не позволяет сэкономить время по сравнению с методом УЦ. Очистка методом УЦ дает больший выход вирусных частиц и более высокую степень очистки, таким образом ее использование является более целесообразным.

Таблица 1. Титр и выход после очистки йодиксанолом.

Образец	Выход (по инф.титру)	Титр ITR, ГК/мл	Инф. Титр	ITR/Инф.титр
Исх. клетки+среда	100%	6,4E+12	1,0E+09	1,3E+04
Неосв. лизат	83,5%	7,1E+12	8,5E+08	1,0E+04
Осв. Лизат	77,2%	2,3E+12	7,8E+08	8,7E+03
Лизат -> йодиксанол	14,4%	4,1E+11	1,5E+08	5,6E+03
Лизат+среда -> йодиксанол	12,5%	1,8E+11	1,3E+08	2,9E+03
Первая фаза очистки полиэтиленгликолем и очистка йодиксанолом	2,5%	3,1E+10	2,7E+07	2,2E+03
Первая и вторая фазы очистки полиэтиленгликолем и очистка йодиксанолом	1,6%	2,1E+10	1,8E+07	2,4E+03

Таблица 2. Титр и выход после очистки полиэтиленгликолем.

Образец	Выход (по инф.титру)	Титр ITR, ГК/мл	Инф. Титр	ITR/Инф.титр
Исх. клетки+среда	100%	6,4E+12	1,0E+09	1,3E+04
Пул среды	15%	1,6E+12	5,0E+07	6,2E+04
Неосв. Лизат	83,5%	7,1E+12	9,3E+08	1,5E+04
Осв. Лизат	77,2%	2,3E+12	4,1E+08	1,1E+04
Первый этап очистки	46,3%	1,9E+12	6,3E+08	6,0E+03
Второй этап очистки	3,4%	6,1E+11	3,4E+07	3,5E+04

Литература

1. *Crosson, Sean M et al. "Helper-free Production of Laboratory Grade AAV and Purification by Iodixanol Density Gradient Centrifugation." Molecular therapy. Methods & clinical development vol. 10 1-7. 8 May. 2018, doi:10.1016/j.omtm.2018.05.001*
2. *Kimura, T et al. "Production of adeno-associated virus vectors for in vitro and in vivo applications." Scientific Reports, 9(1), 13601. https://doi.org/10.1038/s41598-019-49624-w*

UDC 57.083.224 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-163-166

EVALUATION OF VIRAL PARTICLES YIELD AT DIFFERENT STAGES OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS PURIFICATION

Kochina E.A., Mikhailyuk E.A., Glazkova D.V., Bogoslovskaya E.V.

Federal State Budgetary Institution "Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks" of the Federal Biomedical Agency
119121, Moscow, Pogodinskaya d.10 s1
e-mail: evgeniakochina@gmail.com

Here we present results of a comparison of two methods of purification of adeno-associated virus: iodixanol gradient ultracentrifugation and polyethylene glycol solution (PEG 8000) two-stage purification.

Key words: recombinant adeno-associated virus, gene therapy, ultracentrifugation, infectious titer

The use of adeno-associated viruses is a promising trend in gene therapy. One of the key step of gene therapy product testing is experiments on model animals. This step requires a large amount of purified recombinant virus. The most common purification method is iodixanol gradient ultracentrifugation, but polyethylene glycol (PEG8000) two-step purification is method that is more available. Thus, the purpose of this work was to compare these two purification methods.

AAV particles were produced by transfecting a three-plasmid vector system into HEK-293 cells in 150 cm^2 culture flask. The cell biomass was removed with a scraper and transferred into a 50 ml Falcon, precipitated by centrifugation, the supernatant was poured into a separate bottle and the cells were lysed. The cell lysate was clarified (treated with Benzonase® Nuclease, Merck and passed through a 0.45 µm filter). The clarified lysate mixed with the medium was purified by either iodixanol gradient ultracentrifugation followed by dialysis [1] or PEG8000 two-phase purification, or a combination of both. PEG8000 purification was carried out according to the standard protocol [2]. The first stage included sedimentation in 40% PEG8000 / 2.5M NaCl, resuspension in HEPES buffer. The second stage was extraction of AAV with chloroform, separation of viral particles in a mixture of PEG8000/ ammonium sulfate (10%/13.5%) and Amicon Ultra-15 100K MWCO dialysis. In the combined variants, the virus first passed I or I & II PEG8000 purification stages, and then iodixanol gradient purification. After each stage, we analyzed the yield of viral particles in two ways: ITR specific PCR titer, infectious titer on the HT1080 cell line.

15% of the viral particles were in the medium, 83.5% were in the unclarified lysate. The yield of viral particles after lysate iodixanol gradient purification was 14.4% and after lysate and media iodixanol gradient purification — 12.5%, the yield after polyethylene glycol solutions purification was 3.4% (Table 1). Large amount of virus particles is lost through combined purification, so combined purification in useless. The infectious titer of the virus after

iodixanol gradient purification is an order of magnitude higher than the titer of the virus after polyethylene glycol purification, while their PCR titers are approximately equal. Thus, the virus is cleaner after iodixanol gradient, than after polyethylene glycol purification.

In this work, the results of a comparison of two purification methods were shown. Despite the apparent simplicity, the multistage method of PEG purification does not save time in comparison with iodixanol gradient purification method. Iodixanol gradient purification gives a higher yield of viral particles and a higher degree of purification, thus its use is more expedient.

Table 1. Titer after iodixanol purification.

Sample	Yield (Inf.titer)	Titer ITR, vg/ml	Infectious titer	ITR/Inf.titer.
Cell + lysate	100%	6,4E+12	1,0E+09	1,3E+04
Lysate	83,5%	7,1E+12	8,5E+08	1,0E+04
Clarified lysate	77,2%	2,3E+12	7,8E+08	8,7E+03
Lysate -> iodixanol	14,4%	4,1E+11	1,5E+08	5,6E+03
Lysate+cells -> iodixanol	12,5%	1,8E+11	1,3E+08	2,9E+03
PEG I stage+ iodixanol	2,5%	3,1E+10	2,7E+07	2,2E+03
PEG I+II stages+ iodixanol	1,6%	2,1E+10	1,8E+07	2,4E+03

Table 2. Titer after polyethylene glycol purification.

Sample	Yield (Inf.titer)	Titer ITR, vg/ml	Infectious titer	ITR/Inf.titer.
Cell + lysate	100%	6,4E+12	1,0E+09	1,3E+04
Media	15%	1,6E+12	5,0E+07	6,2E+04
Lysate	83,5%	7,1E+12	9,3E+08	1,5E+04
Clarified lysate	77,2%	2,3E+12	4,1E+08	1,1E+04
I stage	46,3%	1,9E+12	6,3E+08	6,0E+03
I + II stages	3,4%	6,1E+11	3,4E+07	3,5E+04

References

1. *Crosson, Sean M et al. "Helper-free Production of Laboratory Grade AAV and Purification by Iodixanol Density Gradient Centrifugation." Molecular therapy. Methods & clinical development vol. 10 1-7. 8 May. 2018, doi:10.1016/j.omtm.2018.05.001*
2. *Kimura, T et al. "Production of adeno-associated virus vectors for in vitro and in vivo applications." Scientific Reports, 9(1), 13601. https://doi.org/10.1038/s41598-019-49624-w*

УДК 615.371 ББК 52.60 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-166-169

РАЗРАБОТКА И ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ «BETUVAX-COV-2» ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ COVID-19.

Красильников И.В., Кудрявцев А.В. Крючков Н.Н., Исаев А.А.

ПАО Институт стволовых клеток человека, 119333, Москва, ул. Губкина, дом 3, стр.2, Россия
E-mail: kiv06@mail.ru

Кандидатная вакцина, содержащая корпускулярный адъювант и рекомбинантный гликозилированный RBD домен вируса SARS-CoV-2, прошла успешно доклинические исследования и допущена к клиническим испытаниям. В ходе проведения доклинических исследований показана безопасность и высокая иммуно-

генность разработанного препарата в опытах на животных, в том числе и на приматах.

Ключевые слова: рекомбинантный RBD антиген, вирус SARS-CoV-2, кандидатная вакцина, иммунитет, доклинические исследования.

Создана кандидатная вакцина («BETUVAX-COV-2») на основе корпускулярного адъюванта и рекомбинантного RBD антигена вируса SARS-CoV-2. Корпускулярный антиген разработан как платформа для вакцин на основе природного бетулина и представвляет собой, как показала электронная микроскопия, сферические частицы размером 100-150 нанометров. Рекомбинантный антиген представлен эпитопом RBD поверхностного антигена S вируса SARS-CoV-2 и Fc фрагментом человеческого иммуноглобулина G1. Полученная комбинация при введении животным вызывала иммунный ответ, а полученные мышиные антитела нейтрализовали вирус SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero.

В производственных условиях были получены экспериментальные серии кандидатной вакцины, которые содержали рекомбинантный антиген в концентрации 10 или 40 мкг/мл и корпускулярный носитель 400 мкг/мл. Доза вакцины составляла 0,5 мл.

Экспериментальные партии кандидатной вакцины были изучены в доклинических исследованиях.

На нескольких видах животных (мыши, крысы, кролики, золотистые хомячки) были исследованы безопасность, острая, подострая и хроническая токсичность вакцинных препаратов. В опытах на животных установлено, что вакцина «BETUVAX-COV-2» не вызывала гибели животных, изменения поведения, снижения двигательной активности, снижения массы тела, что свидетельствовало об отсутствии токсического действия вакцины.

Исследование по оценке формирования гуморального и клеточного иммунного ответа после одно- и двукратной иммунизации у мышей было выполнено для вакцинных препаратов содержащих как 5 мкг, так и 20 мкг рекомбинантного антигена в дозе (0,5 мл). Целью исследования являлась оценка уровня антительного и Т-клеточного ответа при однократном и двукратном внутрибрюшинном введении вакцинного препарата.

В ходе исследования показано, что уровень антител, специфичных к белковому компоненту препарата, увеличивался уже после однократной иммунизации по сравнению показателями, полученными для группы без носителя. Однако, отличия не носили достоверного характера. Статистически достоверное увеличение титров сывороточных антител в образцах привитых мышей наблюдали только после двукратной иммунизации вакцинным препаратом. При этом титры IgG, специфических к белковому компоненту препарата, достоверно увеличивались как в группе животных, получивших белковый препарат в дозе 5 мкг/животное (СГТ=1600), так и 20 мкг/животное (СГТ=2377) по сравнению с группой животных, получивших антиген без носителя ($p<0,05$).

Определение уровня антител в реакции микронейтрализации в сыворотках крови мышей после однократной и двукратной иммунизации показали, что вирус-нейтрализующие антитела формируются только после двукратного введения вакцинного препарата. Титры нейтрализующих антител после двукратной иммунизации препаратом в дозе 5 мкг составили 1:5-1:10 (СГТ=7,43), в дозе 20 мкг - 1:5-1:40 (СГТ=15,2).

Оценку адаптивного CD4+ и CD8+ Т-клеточного иммунного ответа у мышей после однократной и двукратной иммунизаций вакцинными препаратами проводили на мышах. Животных проиммунизировали однократно или двукратно с интервалом 21 день препаратом в дозе 5 мкг/мышь. Через 10 дней после однократной и двукратной иммунизаций у животных были собраны селезенки для выделения спленоцитов. В качестве контроля использовали селезенки интактных животных.

Результаты исследований показали, что Т-клеточный иммунный ответ у экспериментальных животных формировался после двукратной иммунизации. Основная часть антиген-специфичных Т-лимфоцитов была представлена CD4+ эффекторными Т-клетками. В структуре популяции цитокин-продуцирующих Т-клеток преобладали полифункциональные IFNγ-IL-2+TNFa+ CD4+ Т-лимфоциты.

При изучении адаптивного Т-клеточного иммунного ответа на двукратное введение исследуемого препарата в дозах 5 и 20 мкг было установлено, что иммунизация в дозе 20 мкг/мышь приводила к статистически достоверному увеличению относительного содержания антигенспецифичных CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов по сравнению с интактной группой. В группе, получавшей 5 мкг белка также был выявлен достоверный прирост относительного содержания антигенспецифичных CD4+ Т-клеток, тогда как различий с интактной группой по уровню CD8+ Т-лимфоцитов выявлено не было.

В структуре популяций антиген-специфичных CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов преобладали IL-2-продуцирующие клетки (IFNγ-IL-2+TNFa-). Кроме того, в обеих группах было отмечено формирование полифункциональных CD8+ Т-лимфоцитов (IFNγ+IL-2+TNFa+).

Протективные свойства вакцины были исследованы в опытах на золотистых хомяках.

После введения кандидатной вакцины в дозе 20 мкг с интервалом в 21 день и последующим заражением животных высокой дозой вируса на 4 день после заражения у иммунизированных животных вирус не определялся.

Безопасность и иммуногенность вакцины была подтверждена в опытах на макаках-резус.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-166-169

DEVELOPMENT AND PRE-CLINICAL STUDIES OF THE RECOMBINANT VACCINE "BETUVAX-COV-2" FOR PREVENTION OF COVID-19.

Krasilnikov I.V., Kudryavtsev A.V. Kryuchkov N.N., Isaev A.A.

PJSC Human Stem Cells Institute, 119333, Moscow, st. Gubkina, house 3, building 2, Russia
E-mail: kiv06@mail.ru

A candidate vaccine containing a corpuscular adjuvant and a recombinant glycosylated RBD domain of the SARS-CoV-2 virus has successfully passed preclinical studies and is approved for clinical trials. In the course of preclinical studies, the safety and high immunogenicity of the developed drug was shown in experiments on animals, including primates.

Key words: recombinant RBD antigen, SARS-CoV-2 virus, candidate vaccine, immunity, preclinical studies.

A candidate vaccine («BETUVAX-COV-2») based on a corpuscular carrier and a recombinant RBD antigen of the SARS-CoV-2 virus has been created. The corpuscular adjuvant was developed as a platform for vaccines based on natural betulin and is, as shown by electron microscopy, spherical particles with a size of 100-150 nanometers. The recombinant antigen is represented by the RBD epitope of the surface antigen S of the SARS-CoV-2 virus and the Fc fragment of human immunoglobulin G1. The resulting combination, when administered to animals, elicited an immune response, and the resulting mouse antibodies neutralized the SARS-CoV-2 virus in the Vero cell culture.

In a production environment, experimental series of the candidate vaccine were obtained, which contained a recombinant antigen at a concentration of 10 or 40 μg / ml and a particle carrier of 400 μg / ml. The vaccine dose was 0.5 ml.

Experimental batches of the candidate vaccine have been studied in preclinical studies.

The safety, acute, subacute, and chronic toxicity of vaccine preparations were studied on several animal species (mice, rats, rabbits, golden hamsters). In experiments on animals, it found that the Betuvax-CoV-2 vaccine did not cause mortality of animals, changes in behavior, a decrease in physical activity, decrease in body weight, which indicated the absence of the toxic effect of the vaccine.

A study evaluating the formation of the humoral and cellular immune response after single and double immunization in mice was performed for vaccine preparations containing both 5 μg and 20 μg of recombinant antigen in a dose (0.5 ml). The aim of the study was to assess the level of antibody and T-cell responses after single and double intraperitoneal administration of the vaccine preparation.

The study showed that the level of antibodies specific to the protein component of the vaccine increased after a single immunization compared to the values obtained for the placebo group (not contained carrier). However, the differences were not reliable. A statistically significant increase in serum antibody titers in samples of inoculated mice was observed only after double immunization with the vaccine preparation. At the same time, the titers of IgG specific to the protein component of the drug significantly increased both in the group of animals that received the protein preparation at a dose of 5 μg / animal (SGT = 1600) and 20 μg / animal (SGT = 2377) compared with the group of animals, who received placebo ($p < 0.05$).

Determination of the level of antibodies in the reaction of microneutralization in the blood serum of mice after a single and double immunization showed that virus-neutralizing antibodies are formed only after a double injection of the vaccine preparation. Titers of neutralizing antibodies after double immunization with the drug at a dose of 5 μg were 1: 5-1: 10 (SGT = 7.43), at a dose of 20 μg - 1: 5-1: 40 (SGT = 15.2).

Assessment of the adaptive CD4 + and CD8 + T-cell immune response in mice after single and double immunizations with vaccine preparations was carried out in mice. The animals were immunized once or twice at an interval of 21 days with the drug at a dose of 5 μg / mouse. Spleens were collected from animals 10 days after single and double immunizations to isolate splenocytes. The spleens of intact animals were used as a control.

The research results showed that the T-cell immune response in experimental animals was formed after double immunization. The bulk of antigen-specific T-lymphocytes was represented by CD4 + effector T-cells. The structure of the population of cytokine-producing T cells was dominated by polyfunctional IFNγ-IL-2 + TNFa + CD4 + T-lymphocytes.

When studying the adaptive T-cell immune response to double administration of the study drug at doses of 5 and 20 μg, it was found that immunization at a dose of 20 μg / mouse led to a statistically significant increase in the relative content of antigen-specific CD4 + and CD8 + T-lymphocytes compared to the intact group. The group receiving 5 μg of protein also showed a significant increase in the relative content of antigen-specific CD4 + T cells, while there were no differences with the intact group in terms of the level of CD8 + T lymphocytes.

In the structure of populations of antigen-specific CD4 + and CD8 + T-lymphocytes, IL-2-producing cells (IFNγ-IL-2 + TNFa) prevailed. In addition, the formation of polyfunctional CD8 + T-lymphocytes (IFNγ + IL-2 + TNFa +) was noted in both groups.

The protective properties of the vaccine were investigated in experiments on golden hamsters.

After the introduction of the candidate vaccine at a dose of 20 μg with an interval of 21 days and subsequent infection of the animals with a high dose of the virus on the 4th day after infection, the virus was not detected in the immunized animals.

The safety and immunogenicity of the vaccine confirmed in experiments on rhesus monkeys.

УДК 619:57.08(075) DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-169-171

ОЦЕНКА ИММУНОКОРРЕГИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА PHALLUS IMPUDICUS ПО ИЗМЕНЕНИЮ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНОВ ЖИВОТНЫХ

Разин А.Н., Волков М.Ю.

Научно-производственное объединение Биолюкс
192236, г. Санкт-Петербург, ул. Белы Куна, д.34, литер А
pharmlines@yandex.ru

Произведена оценка иммунокоррегирующего свойства препарата базидиального грибв Phallus impudicus с целью в дальнейшем использовать для посерийного контроля препарата в различных лекарственных формах по показателю "Биологическая активность" в условиях лабораторий контрольных служб.

Ключевые слова: Phallus impudicus, веселка, биологическая активность, гастропротектор, иммунокомпетентный.

Биопрепараты на основе базидиальных грибов широко исследуются в настоящее время. Препарат на основе Phallus impudicus получают методом глубинного культивирования мицелия с последующей сублимационной сушкой и измельчением. Фракционируют через сито диаметром 50 мкм. Данный препарат ранее исследовали на антиоксидантную, иммунологическую и противоканцерогенную активности [3, 4].

Для подтверждения иммунокоррегирующего действия препарата Phallus impudicus (ВЕСЕЛКА) исследования проводили на 150 крысах-самцах, массой 120-180 г. В опыте использовали четыре группы животных: 1 – животные с интактной иммуной системой, 2 – животные с интактной иммунной системой, которым вводили водную суспензию препарата ВЕСЕЛКА, 3 – животные с иммунной депрессией, 4 – животные, которым на фоне иммунной депрессии, вводили водную суспензию препарата ВЕСЕЛКА. У крыс иммунодефицитное состояние, сопровождавшееся снижением массы тимуса и селезенки, вызывали введением 0.3 мл раствора гидрокортизона ацетата (ГКЗ) в концентрации 25 мг/мл внутрибрюшинно. Через 48 часов после введения ГКЗ, крыс делили на две равные группы, одной из которых в течение последующих трех дней вводили водную суспензию препарата ВЕСЕЛКА в объеме 0,2 мл.

О характере влияния препарата ВЕСЕЛКА на функциональное состояние иммунной системы судили по изменению иммунокомпетентных органов - относительной массы тимуса (ОМТ) и относительной массы селезенки (ОМС). Для дополнительной оценки биологического действия препарата, у этих животных исследовалось состояние слизистой оболочки желудка. С этой целью всем четырем группам крыс вводили внутрь по 1 мл абсолютного спирта, через 1 час животных декапитировали, извлекали тимус и селезенку

и желудок. Определяли ОМТ и ОМС. Оценку состояния слизистой оболочки желудка проводили по патентованному методу "Владивостокского государственного медицинского университета" [2]. У контрольных и опытных животных измеряли длину участков поражений слизистой оболочки желудка в мм. После суммирования полученных значений вычисляли средний показатель поражения в мм для одного животного в каждой группе.

В результате анализа полученных данных оказалось, что под влиянием ГКЗ ОМТ снизилась в среднем на 11 %, а ОМС – на 20,5%. При введении крысам препарата ВЕСЕЛКИ независимо от способа его применения наблюдалось восстановление массы иммунокомпетентных органов. Относительная масса последних оказалась выше контрольных величин в среднем на 6-9%.

Экспериментальные данные, полученные с помощью достаточно простого и надежного морфометрического метода [1] оценки иммунокомпетентных органов у животных с иммунодепрессией свидетельствуют, что препарат ВЕСЕЛКА обладает иммуномодулирующим действием.

Анализ состояния слизистой оболочки желудка у этих животных показал, что средняя длина участков деструктивных поражений в контроле (группа 1) составила в среднем 4,13 мм, во 2-ой группе – 3,5 мм в 3-й группе – 28,3 мм, тогда как в 4-ой группе, длина участков деструктивных поражений составила всего лишь 9,1 мм.

Таким образом, показано, что на фоне иммунодефицитного состояния у животных более выражено защитное действие препарата на слизистую оболочку желудка. Наши данные подтверждает наличие гастропротекторного действия Веселки на интактных животных.

Литература

1. *Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия.// Руководство. — М.: Медицина, 1990. — 384 с.: ил.*
2. *Патент RU 2469324*
3. *Разин А.Н. Технология получения биологически активной субстанции Phallus impudicus и её применение для конструирования биопрепаратов с противоопухолевыми и антиоксидантными свойствами // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Москва 2011*
4. *Разин А.Н., Волков М.Ю. Изучение противоопухолевых свойств высших базидиомицетов Шиитаке (Lentinus edodes), Трутовика лиственничного (Laricifomes officinalis) и Веселка (Phallus impudicus) // Ветеринарная медицина. – 2009 г. – № 1-2. – С. 71-75.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-169-171

EVALUATION OF THE IMMUNOCORRECTIVE EFFECT OF VESELKA ON CHANGES IN IMMUNOCOMPETENT ORGANS OF ANIMALS

Razin A. N., Volkov M. Yu.

Biolux research and production Association, 192236, St. Petersburg, Bely Kuna str., 34, letter A
pharmlines@yandex.ru

The immunocorrective properties of the basidial fungus Phallus impudicus were evaluated in order to further use the drug in various dosage forms for batch control according to the indicator "Biological activity" in the conditions of control services laboratories.

Keywords: Phallus impudicus, Veselka, biological activity, gastroprotector, immunocompetent.

Biopreparations based on basidial fungi are widely studied at the present time. Biological product on the basis of the Phallus impudicus is obtained by submerged cultivation of mycelium with subsequent freeze drying and grinding. Fractionated through a sieve with a diameter of 50 microns. This biopreparation was previously studied for antioxidant, immunological, and anti-carcinogenic activity [3, 4].

To confirm the immunocorrective effect of VESELKA, studies were performed on 150 male rats, weighing 120-180 g. The experiment used four groups of animals: 1 – animals with an intact immune system; 2 – animals with an intact immune system that were injected with an aqueous suspension of VESELKA; 3 – animals with immune depression; 4 – animals that were injected with an aqueous suspension of VESELKA against the background of immune depression. The experiment was reproduced 5 times. In three experiments, the suspension of the drug VESELKA was administered subcutaneously, in other two – it was administered orally.

In rats, the immunodeficiency state, accompanied by a decrease in the mass of the thymus and spleen, was induced by the introduction of 0.3 ml of a solution of hydrocortisone acetate (HCA) at a concentration of 25 mg/ml via intraperitoneal injection. 48 hours after the introduction of HCA, the rats were divided into two equal groups, one of which was subjected to the aqueous suspension of VESELKA in the amount of 0.2 ml for the next three days.

The nature of the effect of VESELKA on the functional state of the immune system was judged by changes in immunocompetent organs: the relative mass of the thymus (RMT) and the relative mass of the spleen (RMS). To further evaluate the biological effect of the drug, the state of the gastric mucosa was studied in these animals. For this purpose, all four groups of rats were injected with 1 ml of absolute alcohol; 1 hour after that, the animals were decapitated, and the thymus, spleen and stomach were removed. The RMT and RMS were determined. The state of the gastric mucosa was evaluated using the patented method of the Vladivostok state medical University [2]. In control groups and experimental groups of animals, the length of lesions of the gastric mucosa was measured in mm. After summing up the obtained values, the average lesion index in mm was calculated for one animal in each group.

The analysis of the data revealed that under the influence of HCA, OMT decreased on average by 11 %, and RMS - 20.5%. When the drug VESELKA was administered to rats, regardless of which way it was administered, the mass of immunocompetent organs was partially restored. The relative mass of the latter was higher than the control values by an average of 6-9%.

Experimental data was obtained using a fairly simple and reliable morphometric method [1] for evaluating immunocompetent organs in animals with immunosuppression, and indicate that VESELKA has an immunomodulatory effect.

Analysis of the state of the gastric mucosa in these animals showed that the average length of destructive lesions in the control group (group 1) averaged 4.13 mm, in the 2nd group -3.5 mm in the 3rd group-28.3 mm, while in the 4th group, the length of destructive lesions was only 9.1 mm.

Thus, it is shown that the protective effect of the drug on the gastric mucosa is more pronounced against the background of immunodeficiency in animals. Our data confirms the presence of gastroprotective effect of VESELKA on the animals with intact immunity.

References

1. *Avtandilov G. G. Medical morphometry.// Guide. - Moscow: Medicine, 1990. - 384 p.: Il.*
2. *Patent RU 2469324+*
3. *Razin A. N. Technology for obtaining the biologically active substance Phallus impudicus and its application for the construction of biological products with antitumor and antioxidant properties / / abstract of the thesis for the degree of candidate of biological Sciences, Moscow 2011*
4. *Razin A. N., Volkov M. Yu. Study of antitumor properties of higher basidiomycetes Shiitake (Lentinus edodes), larch tinder (Laricifomes officinalis) and Veselka (Phallus impudicus) / / Veterinary medicine. - 2009-No. 1-2. - Pp. 71-75.*

УДК 577.112, 577.083 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-171-173

АНТИБИОПЛЕНОЧНАЯ АКТИВНОСТЬ В-ШПИЛЕЧНЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ МОРСКИХ ПОЛИХЕТ

Сафронова В.Н., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В.

Государственный научный центр «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук» Москва, Россия
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10
e-mail: saf-victorianik@yandex.ru

Получены рекомбинантные β-шпилечные антимикробные пептиды из полихет *Capitella teleta* и *Abarenicola pacifica* и исследована их антибиопленочная активность.

Ключевые слова: антимикробные пептиды; β-шпилечная структура; антибиопленочная активность.

Биопленки представляют собой совокупность микробных клеток, погруженных во внеклеточный полимерный матрикс, который защищает их от воздействия внешних факторов. Около 80% хронических инфекций обусловлены образованием биопленок на биотических и абиотических поверхностях. Антибиотики в высоких концентрациях, используемых для разрушения или предотвращения образования биопленок, иногда неэффективны или токсичны для пчеловека. Поиск новых терапевтических агентов, позволяющих бороться с микроорганизмами в составе биопленок, является одной из актуальных проблем современной медицины. Особый интерес представляют антимикробные пептиды (АМП) ввиду их высокой антимикробной активности и потенциальной возможности применения в терапии против бактерий, резистентных к традиционным антибиотикам. В качестве потенциальных антибиопленочных агентов был исследован ряд аналогов природных АМП из морских полихет *Capitella teleta* (Ct) и *Abarenicola pacifica* (Ap). Пептиды были получены с использованием системы гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* BL21 (DE3). Было показано, что данные пептиды проявляют высокую антибактериальную активность *in vitro* по отношению к условно-патогенным грамположительным и грамотрицательным бактериям, а также не оказывают повреждающего действия на мембраны эукариотических клеток. Было исследовано влияние пептидов Ct и Ap на биопленки, образуемые бактерией *P. aeruginosa* PAO1, которая относится к группе ESKAPE-патогенов и является основной причиной внутрибольничных инфекций во всем мире. Было установлено, что пептид Ap полностью ингибирует процесс формирования биопленок при концентрации 0,63 мкг/мл, а при субингибирующей концентрации 0,08 мкг/мл уменьшает массу биопленок примерно на 30%. Пептид Ct также полностью подавляет образование биопленок в минимальной ингибирующей концентрации (МИК, 1,25 мкг/мл), но в субингибирующих концентрациях заметно стимулирует образование бактериальной пленки. Подобный эффект наблюдается для некоторых антибиотиков, таких как аминогликозиды, фторхинолоны и тетрациклины. Кроме того, пептиды Ct и Ap влияют на предварительно сформированные биопленки *P. aeruginosa* PAO1, приводя к деградации внеклеточного полимерного матрикса. Стоит отметить, что было исследовано влияние пептида Ct на формирование биопленок бактерий *E. coli*, *K. pneumoniae* и *A. baumannii*. Было установлено, что эффект стимуляции образования бактериальных пленок при низких концентрациях пептида наблюдается лишь в случае бактерий P. aeruginosa PAO1. Таким образом, дальнейшей задачей станет более детальное изучение механизма действия данных пептидов в отношении патогенных микроорганизмов, формирующих биопленки.

Работа поддержана грантом РФФИ-БРИКС № № 18-54-80026.

UDC 577.112, 577.083 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-171-173

ANTIBIOFILM ACTIVITY OF B-HAIPRIN ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM MARINE POLYCHAETA

V.N. Safronova, P.V. Panteleev, T.V. Ovchinnikova

M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Russia, 117997, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 16/10
e-mail: saf-victorianik@yandex.ru

Recombinant β-hairpin antimicrobial peptides were obtained from marine polychaeta *Capitella teleta* and *Abarenicola pacifica*, and their antibiofilm activity was studied.

Key words: antimicrobial peptide; β-hairpin structure; antibiofilm activity.

Biofilms constitute a community of microbial cells embedded in an extracellular polymeric matrix that protects them from external action. About 80% of chronic infections are caused by biofilm formation on biotic and abiotic surfaces. Antibiotics at high concentrations used to destroy or prevent biofilm formation are sometimes ineffective or toxic for humans. Therefore, new antibacterial pharmaceuticals are urgently needed to combat biofilms formation. Antimicrobial peptides (AMPs) are promising in this area due to their high antimicrobial activity and other benefits as compared to conventical antibiotics. Recombinant analogs of natural peptides from the marine polychaetes *Capitella teleta* and *Abarenicola pacifica* were obtained with the use of the *E. coli* BL21(DE3) heterologous expression system. These peptides, designated as Ct and Ap, are active against opportunistic gram-positive and gram-negative bacteria and also non-toxic towards mammalian cells. Effect of Ct and Ap on biofilms of *P. aeruginosa* PAO1 (ESKAPE pathogens group) - the main cause of nosocomial infections worldwide, were investigated. It was shown that Ap completely inhibited the process of biofilm formation at concentration of 0.63 μg/ml, and at subinhibitory

concentration of 0.08 μg/ml reduced the mass of biofilms approximately by 30%. Ct also totally suppressed the formation of biofilms at the minimum inhibitory concentration (MIC, 1.25 μg/ml), but significantly stimulated the formation of biofilms at subinhibitory concentrations. The similar effect was observed for some antibiotics such as aminoglycosides, fluoroquinolones, and tetracyclines. In addition, Ct and Ap affect the pre-formed biofilms of the *P. aeruginosa* PAO1, resulting in the degradation of the extracellular polymeric matrix. Effects of Ct on the formation of *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *A. baumannii* biofilms was were studied. It was found that the effect of biofilm stimulation is peculiar only to the *P. aeruginosa* PAO1. Thus, this work provides a basis for a more detailed study of the mechanism of action of these peptides against pathogenic microorganisms forming biofilms.

This work was supported by the RFBR-BRICS project No. 18-54-80026.

УДК 577.112, 577.181 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-173-174

НОВОЕ СЕМЕЙСТВО ПРОЛИН-БОГАТЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ, ИНГИБИРУЮЩИХ ТРАНСЛЯЦИЮ У БАКТЕРИЙ

Сафронова В.Н., Кругликов Р.Н., Овчинникова Т.В., Пантелеев П.В.

Государственный научный центр «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», Москва, Россия
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10
e-mail: saf-victorianik@yandex.ru

Получен новый пролин-богатый антимикробный пептид из альпака *Vicugnia pacos*, а также его модифицированные аналоги. Изучена биологическая активность пептидов, а также роль N- и C-концевых фрагментов при действии на бактериальные клетки.

Ключевые слова: антимикробные пептиды; пролин-богатые пептиды; ингибиторы трансляции.

Около половины известных антибиотиков нацелены на аппарат трансляции клеток-мишеней. Ингибиторы трансляции нового поколения должны обладать высокой эффективностью в отношении широкого спектра патогенов и отличными от известных антибиотиков механизмами действия, что снизит вероятность возникновения кросс-резистентности к ним. Один из классов искомых соединений включает пролин-богатые антимикробные пептиды (ПБ-АМП), ингибирующие трансляцию у бактерий путём блокирования рибосомного тоннеля и пептидил-трансферазного центра. Важно отметить, что для ПБ-АМП в целом характерно наличие множества сайтов связывания, что сводит к минимуму риск возникновения бактериальной резистентности посредством модификаций в рРНК.

Целью данной работы являлось изучение представителей нового структурного семейства ПБ-АМП, обнаруженных у лам, викуний и верблюдов и состоящих из 39-41 аминокислотных остатков. В частности, с использованием бактериальной системы экспрессии в клетках *E. coli* BL21(DE3) и методом химического синтеза был получен пептид VpBac39 из альпака *Vicugna pacos*, а также его модифицированные аналоги. Для каждого пептида были определены минимальные ингибирующие концентрации в отношении широкой панели бактериальных штаммов. Для установления возможного механизма действия была изучена способность пептидов ингибировать процесс трансляции с использованием бактериальной бесклеточной белок-синтезирующей системы, а также изучено влияние пептидов на проницаемость бактериальных мембран. Потенциальное цитотоксическое действие изучаемых пептидов оценивалась с помощью гемолитического теста.

Показано, что N-концевой участок [1-22] пептида VpBac39 обеспечивает способность ингибировать трансляцию у бактерий, что характерно для известных онкоцин-подобных ПБ-АМП. Вместе с тем, наличие C-концевого гидрофобного участка [23-39] позволяет природному пептиду нарушать целостность цитоплазматической мембраны бактерий и эффективно проникать в клетки без использования специфических белков-транспортёров, например, SbmA. Показано, что пептид VpBac39 не проявляет выраженных цитотоксических свойств и способен эффективно подавлять рост широкого спектра клинически значимых бактерий, что позволяет рассматривать его в качестве перспективной основы для создания новых антибиотиков.

Работа поддержана грантом РНФ (соглашение № 21-74-00100).

UDC 577.112, 577.181 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-173-174

NOVEL FAMILY OF PROLINE-RICH ANTIMICROBIAL PEPTIDES INHIBITING BACTERIAL TRANSLATION

V.N. Safronova, R.N. Kruglikov, T.V. Ovchinnikova, P.V. Panteleev

M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow Russia, 117997, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 16/10
e-mail: saf-victorianik@yandex.ru

A new proline-rich antimicrobial peptide from alpaca (Vicugnia pacos) was obtained, as well as its modified analogs. The biological activity of the peptides was studied, and also the role of the N- and C-terminal fragments, when acting on bacterial cells, was analyzed.

Key words: antimicrobial peptides; proline-rich peptides; translation inhibitors.

About a half of known antibiotics interact with the translation machinery of target cells and therefore carry substantial importance for healthcare. New generation of translation inhibitors has to be highly effective against a wide range of pathogens and also must have different mechanism of action to prevent the cross-resistance effects. Proline-rich antimicrobial peptides (PR-AMP) that inhibit bacterial translation by plugging exit tunnel and peptidyl transferase center belong to such molecules and that is why they catch scientists attention. Notably, PR-AMP provide multiple contacts in the ribosomal exit tunnel, which minimizes the risk of bacterial resistance due to modifications in rRNA.

The aim of this work was to examine members of the new structural family of PR-AMP, identified in llamas, vicunas and camels and consisting of 39-41 amino acid residues. In particular, using the heterologous *E. coli* BL21(DE3) expression system and the chemical synthesis method, the VpBac39 peptide from the alpaca (*Vicugna pacos*), as well as its modified analogs were obtained. For each peptide, minimum inhibitory concentration was determined against a wide panel of bacterial strains. The ability of peptides to inhibit translation process was studied using a bacterial cell-free protein-synthesizing system so that to establish a possible mechanism of action. The effect of peptides on the permeability of bacterial membranes was also studied. The potential cytotoxic effect of the investigated peptides was evaluated using a hemolytic assay.

It was shown that the N-terminal region [1-22] of the VpBac39 peptide provides the ability to inhibit translation in bacteria, which is typical for the known oncocin-like PR-AMP. At the same time, the presence of C-terminal hydrophobic region [23-39] allows the natural peptide to disrupt the integrity of the cytoplasmic membrane of bacteria and effectively penetrate cells without using specific transporter proteins, for example, SbmA. It was estimated that the VpBac39 peptide did not exhibit stimulant cytotoxic properties and was able to effectively suppress the growth of a wide range of clinically significant bacteria, which made it a promising scaffold for the development of new antibiotics.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant № 21-74-00100).

УДК 615.371 ББК 52.66 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-174-176

ИНДУКЦИЯ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА РЕКОМБИНАНТНЫМ ШТАММОМ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИМ КАССЕТУ ГЕНОВ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА МАРБУРГ

Семенова А.В., Гражданцева А.А., Антонец Д.В., Карпенко Л.И., Старостина Е.В., Боргоякова М.Б., Кочнева Г.В.

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора, 630559, Кольцово, Россия, E-mail: tkacheva_av@mail.ru

Сконструированный рекомбинантный штамм MVA-GP-VP40-MARV кроме индукции гуморального иммунитета, также формирует клеточный иммунный ответ на вирус Марбург, и может рассматриваться как перспективная вакцина против лихорадки Марбург.

Ключевые слова: Вирус осповакцины, штамм MVA, вирусоподобные частицы, вирус Марбург.

На основе высокоаттенуированного штамма MVA вируса осповакцины ранее нами был сконструирован рекомбинантный штамм MVA-GP-VP40-MARV, экспрессирующий кассету структурных генов GP и VP-40 вируса Марбург (MARV) с образованием иммуногенных вирусоподобных частиц (ВПЧ). Такая платформа (безопасный вирусный вектор и непатогенные вирусоподобные частицы, имитирующие вирионы патогена) является наиболее перспективной для создания эффективных вакцин против особо опасных инфекций, таких как лихорадка Марбург [1]. Было показано, что сконструированный штамм MVA-GP-VP40-MARV обеспечивает 100%-ную защиту морских свинок от летальной инфекции MARV (50 $ЛД_{50}$) при двукратной вакцинации в дозе 10^8 БОЕ/животное внутримышечно с интервалом 4 недели.

С целью оценки Т-клеточного иммунного ответа, индуцированного рекомбинантом MVA-GP-VP40-MARV, был проведён анализ структуры генов GP и VP40 MARV с использованием оригинального программного обеспечения TEpredict [2] и предсказана структура пептидов, содержащих Т-хелперные эпитопы этих белков. Несмотря на то, что программа TEpredict не предназначена для предсказания эпитопов, рестриктированных молекулами MHCII класса морской свинки, мы провели предсказание нонамерных пептидов, способных связываться с наиболее широким спектром алломорф молекул MHCII класса, и выбрали фрагменты длиной 16-25 а.к.о., содержащие несколько таких эпитопов. Пептиды были разделены на две группы, соответствующие белкам VP40 и GP, и использованы в виде соответствующих смесей для стимуляции спленоцитов вакцинированных морских свинок.

Оценку клеточного иммунитета проводили через 3 недели после 2-й иммунизации методом внутриклеточного окрашивания цитокинов с последующим анализом на проточном цитометре. В качестве источника Т-клеток использовали спленоциты, полученные стандартным методом из селезёнок морских свинок, а в качестве индикаторного цитокина – интерферон-гамма (ИФНγ). Стимуляцию спленоцитов проводили смесью синтетических пептидов, представляющих потенциальные CD4+ Т-клеточные эпитопы белков GP и VP40 вируса Марбург.

Статистически значимое увеличение количества ИФНγ-продуцирующих CD4+ Т-лимфоцитов по сравнению с контролем ($p<0,01$) было зарегистрировано только при стимуляции спленоцитов смесью пептидов белка GP MARV. Полученные данные свидетельствуют о способности рекомбинантной вакцины MVA-GP-VP40-MARV индуцировать не только гуморальное, но и клеточное звено иммунитета против инфекции MARV, что обеспечивает высокую протективность рекомбинантного штамма MVA-GP-VP40-MARV. Кроме того, нам удалось экспериментально подтвердить биологическую активность Т-хелперных эпитопов белка GP MARV, предсказанных с помощью программы TEpredict.

Литература

1. *Malherbe D.C., Domi A., Hauser M.J., Meyer M., Gunn B.M., Alter G., Bukreyev A., Guirakhoo F. Modified vaccinia Ankara vaccine expressing Marburg virus-like particles protects guinea pigs from lethal Marburg virus infection. Vaccines. 2020. Vol. 5. № 1.P. 78.*
2. *Antonets D.V., Maksyutov A.Z. TEpredict: Software for T-Cell epitope prediction. Molecular Biology, 2010. Vol. 44. № 1. P. 119–127.*

UDK 615.371 BBK 52.66 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-174-176

INDUCTION OF T-CELL IMMUNE RESPONSE BY A RECOMBINANT STRAIN OF VACCINIA VIRUS EXPRESSING A CASSETTE OF STRUCTURAL PROTEIN'S GENES OF MARBURG VIRUS

Semenova A.V., Grazhdantseva A.A., Antonets D.V., Karpenko L.I., Starostina E.V., Borgoyakova M.B., Kochneva G.V.

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, 630559
E-mail: tkacheva_av@mail.ru

The constructed recombinant strain MVA-GP-VP40-MARV, in addition to the induction of humoral immunity, also forms specific cellular immunity to the Marburg virus, and therefore can be considered as a promising vaccine against Marburg fever.

Key words: Vaccinia virus, MVA strain, virus-like particles, Marburg virus.

On the basis of the highly attenuated strain MVA of vaccinia virus, we have previously constructed a recombinant strain MVA-GP-VP40-MARV expressing the cassette of structural GP and VP-40 genes of Marburg virus (MARV) with the formation of immunogenic virus-like particles (VLP). Such a platform (a safe viral vector and non-pathogenic virus-like particles mimicking virions of a pathogen) is the most promising for creating effective vaccines against especially dangerous infections, such as Marburg fever [1]. It was shown that the constructed strain MVA-GP-VP40-MARV provides 100% protection of guinea pigs against lethal MARV infection (50 LD_{50}) when animals were intramuscularly vaccinated twice at a dose of 10^8 PFU with an interval of 4 weeks.

In order to assess the T-cell immune response induced by the recombinant MVA-GP-VP40-MARV, the structure of the GP and VP40 MARV genes was analyzed using the original TEpredict software [2] and the structure of peptides containing T-helper epitopes of these proteins was predicted. Despite the fact that the TEpredict program is not designed to predict epitopes restricted by guinea pig MHCII molecules, we predicted nonameric peptides capable of binding to the widest range of allomorphic MHCII class molecules and selected fragments 16-25 a.a. in length containing several such epitopes. The peptides were divided into two groups, corresponding to the VP40 and GP proteins, and used as appropriate mixtures to stimulate the splenocytes of vaccinated guinea pigs.

Evaluation of cellular immunity was carried out 3 weeks after the 2nd immunization by the method of intracellular staining of cytokines, followed by analysis on a flow cytometer. Splenocytes obtained by the standard method from guinea pig spleens were used as a source of T cells, and interferon-gamma (IFNγ) was used as an indicator cytokine. Splenocytes were stimulated with a mixture of synthetic peptides representing potential CD4 + T-cell epitopes of the GP and VP40 proteins of Marburg virus.

A statistically significant increase in the number of IFNγ-producing CD4 + T-lymphocytes compared to the control ($p < 0.01$) was recorded only when splenocytes were stimulated with a mixture of GP MARV protein peptides. The data obtained indicate the ability of the recombinant MVA-GP-VP40-MARV vaccine to induce not only the humoral, but also the cellular component of immunity against MARV infection, which ensures the high protection of the recombinant MVA-GP-VP40-MARV strain. In addition, we were able to experimentally confirm the biological activity of the T-helper epitopes of the GP MARV protein predicted using the TEpredict program.

References

1. *Malherbe D.C., Domi A., Hauser M.J., Meyer M., Gunn B.M., Alter G., Bukreyev A., Guirakhoo F. Modified vaccinia Ankara vaccine expressing Marburg virus-like particles protects guinea pigs from lethal Marburg virus infection. Vaccines. 2020. Vol. 5. № 1.P. 78.*
2. *Antonets D.V., Maksyutov A.Z. TEpredict: Software for T-Cell epitope prediction. Molecular Biology, 2010. Vol. 44. № 1. P. 119–127.*

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ПРОТИВ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ COVID-19

BIOTECHNOLOGY IN PHARMACEUTICAL MANUFACTURING, VACCINES AND DIAGNOSTIC TEST-SYSTEM FOR NEW CORONAVIRUS INFECTION COVID-19

1. СПОСОБНОСТЬ ЭКСТРАКТА AURICULARIA AURICULAR-JUDAE
ПОДАВЛЯТЬ РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСА ГРИППА
Потехина А., Алексюк П.Г., Зайцева И.А., Соколова Н.С.,
Омиртаева Э.С., Алексюк М.С., Богоявленский А.П., Березин В.Е. 178

ABILITY OF AURICULARIA AURICULAR-JUDAE EXTRACT
TO SUPPRESS INFLUENZA VIRUS REPRODUCTION
Potekhina A., Alexyuk P.G., Zaitseva I.A., Sokolova N.S.,
Omirtayeva E.S., Alexyuk M.S., Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E. 179

2. ПРИМЕНЕНИЕ МИНИБИОРЕАКТОРОВ AMBR15 НА ЭТАПЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ПРОЦЕССА СУСПЕНЗИОННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК
CHO-ПРОДУЦЕНТОВ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА НА ОСНОВЕ ПРИНЦИПОВ QbD
Захаров З.В., Морозов А.Н., Яхин И.Р. 180

APPLICATION OF AMBR15 MINIBIOREACTORS IN CHARACTERIZATION OF SUSPENSION
MONOCLONAL ANTIBODY CHO-PRODUCER CELL CULTURE PROCESS BASED ON QbD PRINCIPLES
Zakharov Z.V, Morozov A.N., Yakhin I.R. 181

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НАБОРА
ДЛЯ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ SARS-COV-2
А.С. Курочкина 182

DETERMINATION OF THE DIAGNOSTIC SENSITIVITY OF THE KIT
FOR PCR DIAGNOSTICS OF CORONA VIRUS INFECTION SARS-COV-2
A. Kurochkina 183

УДК 582.284:543.061 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-178-179

СПОСОБНОСТЬ ЭКСТРАКТА AURICULARIA AURICULAR-JUDAE ПОДАВЛЯТЬ РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСА ГРИППА

Потехина А.[1], Алексюк П.Г.[2], Зайцева И.А.[2], Соколова Н.С.[2], Омиртаева Э.С.[2], Алексюк М.С.[2], Богоявленский А.П.[2], Березин В.Е.[2]

[1] КазНПУ им. Абая,
[2] ТОО «Научно – производственный цент микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан
050010, Алматы, Богенбай батыра, 105, virprot@mail.ru

Проводилось изучение способности экстракта *Auricularia auricular-judae* подавлять репродукцию вируса гриппа. Показано, что индекс терапевтической активности экстракта сопоставим с показателями коммерческих препаратов тамифлю и ремантадин.

Ключевые слова: антивирусная активность, гриб, *Auricularia auricular-judae*

Поиск антивирусных препаратов, специфически подавляющих репродукцию вируса, является весьма сложной задачей, поэтому поиск новых источников получения подобных соединений остается актуальной задачей вирусологии. Одним из перспективных источников для поиска и выделения новых биологически активных соединений в последние годы являются съедобные грибы [1]. В наших исследованиях проводилось изучение способности экстракта *Auricularia auricular-judae* подавлять репродукцию вируса гриппа.

Мицелий гриба *Auricularia auricular-judae* отмывали водой и экстрагировали 3 кратным объемом 75-85% этанола в течение 18 часов при комнатной температуре. Полученный экстракт лиофильно высушивали и использовали для исследований.

Изучение токсичности и специфической противовирусной активности исследуемых препаратов проводили в соответствии с методическими рекомендациями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [3]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ «Microsoft Excel».

После получения спиртового экстракта *Auricularia auricular-judae* установлено, что согласно «Согласованной на глобальном уровне системе классификации опасности и маркировки химической продукции» (СГС) (IV пересмотренное издание, ООН, 2011 г.) исследуемый экстракт можно отнести к V классу – малотоксичные препараты.

В дальнейших исследованиях проводилось изучение способности экстракта подавлять репродукцию вируса гриппа с разной антигенной структурой в интервале доз от 0,025 мкг/мл до 1,25 мкг/мл.

Установлено, что в исследованном диапазоне доз экстракт *Auricularia auricular-judae* обладал выраженными противовирусными свойствами.

Сравнительное изучение противовирусного действия экстракта при испытании на различных штаммах вируса гриппа в сопоставлении с противовирусной активностью коммерческих противогриппозных синтетических препаратов – осельтамивир (тамифлю) и ремантадин, показало, что исследуемый экстракт сопоставим по показателю ХТИ коммерческих противогриппозных препаратов при тестировании на разных штаммах вируса.

При изучении спиртового экстракта *Auricularia auricular-judae* установлено, что препарат способен эффективно подавлять репродукцию вирусов гриппа с разной антигенной структурой. При этом его индекс терапевтической активности в несколько раз превышал показатель коммерческих препаратов тамифлю и ремантадин.

Литература

1. *Brandt C. R., Pirano F. Mushroom antiviral // Recent Res Dev Antimicrob Agent Chemotherю. – 2000. - Vol.4. – P.11—26.*

2. *Klimov A., Balish A., Veguilla V., Sun H., Schiffer J., Lu X., Katz J.M., Hancock K. Influenza virus titration, antigenic characterization, and serological methods for antibody detection // Influenza Virus. – 2012. – V. 865. – P.25–51. doi: 10.1007/978-1-61779-621-0_3*

3. *Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.*

UDK 582.284:543.061 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-178-179

ABILITY OF AURICULARIA AURICULAR-JUDAE EXTRACT TO SUPPRESS INFLUENZA VIRUS REPRODUCTION

Potekhina A.[1], **Alexyuk P.G.**[2], **Zaitseva I.A.**[2], **Sokolova N.S.**[2], **Omirtayeva E.S.**[2], **Alexyuk M.S.**[2], **Bogoyavlenskiy A.P.**[2], **Berezin V.E.**[2]

[1] *Abai Kazakh National Pedagogical University,*
[2] *Research and Production Center for microbiology and virology, Almaty, Kazakhstan*
050010, Almaty, Bogenbay batyr. Str., 105, virprot@mail.ru

The ability of the *Auricularia auricular-judae* extract to suppress the reproduction of the influenza virus was studied. It was shown that the index of the therapeutic activity of the extract is comparable to that of commercial preparations Tamiflu and Remantadine.

Key words: antiviral activity, fungus, *Auricularia auricular-judae*

The search for antiviral drugs that specifically suppress the reproduction of the virus is a very difficult task; therefore, the search for new sources for obtaining such compounds remains an urgent task of virology. Edible mushrooms are one of the promising sources for the search and isolation of new biologically active compounds in recent years [1]. In our studies, we studied the ability of *Auricularia auricular-judae* extract to suppress the reproduction of the influenza virus.

Auricularia auricular-judae's mycelium was washed with water and extracted with 3 times the volume of 75-85% ethanol for 18 hours at room temperature. The obtained extract was lyophilized and used for further research.

The study of toxicity and specific antiviral activity of the investigated preparations was carried out in accordance with the methodological recommendations of the "Guidelines for conducting preclinical studies of drugs" [3]. Statistical processing of the results was carried out using the Microsoft Excel software package.

After obtaining the ethanolic extract of *Auricularia auricular-judae*, it was found that according to the "Globally Harmonized System of Classification of Hazard and Labeling of Chemical Products" (GHS) (IV revised edition, UN, 2011), the investigated extract can be attributed to the V class - low-toxic drugs.

In further studies, the ability of the extract to suppress the reproduction of influenza virus with a different antigenic structure was studied in the dose range from 0.025 μg / ml to 1.25 μg / ml.

It was found that in the studied dose range, the extract of *Auricularia auricular-judae* possessed the pronounced antiviral properties.

A comparative study of the antiviral effect of the extract on the influenza virus in comparison with the antiviral activity of commercial anti-influenza synthetic drugs (oseltamivir (tamiflu) and remantadine), showed that the investigated extract was comparable in terms of CTI of commercial anti-influenza drugs in experiments with different strains of the virus.

It was found that ethanolic extract of Auricularia auricular-judae is able to effectively suppress the reproduction of influenza viruses with different antigenic structures. At the same time, its index of therapeutic activity was several times higher than that of commercial drugs Tamiflu and Remantadine.

Literature

1. *Brandt C. R., Pirano F. Mushroom antiviral // Recent Res Dev Antimicrob Agent Chemotherю. – 2000. - Vol.4. – P.11—26.*

2. *Klimov A., Balish A., Veguilla V., Sun H., Schiffer J., Lu X., Katz J.M., Hancock K. Influenza virus titration, antigenic characterization, and serological methods for antibody detection // Influenza Virus. – 2012. – V. 865. – P.25–51. doi: 10.1007/978-1-61779-621-0_3*

3. *Mironov A.N. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. - M .: Grif i K, 2012 .-944 p.*

УДК 57.085.23:606 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-180-181

ПРИМЕНЕНИЕ МИНИБИОРЕАКТОРОВ AMBR15 НА ЭТАПЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОЦЕССА СУСПЕНЗИОННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК CHO-ПРОДУЦЕНТОВ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА НА ОСНОВЕ ПРИНЦИПОВ QBD

Захаров З.В., Морозов А.Н., Яхин И.Р.

АО «Генериум», Владимирская обл., пос. Вольгинский, Россия
601125, Владимирская обл., пос. Вольгинский, ул. Владимирская, 14
e-mail: zakharov@ibcgenerium.ru

Показан системный подход по характеристике процесса культивирования клеток CHO-продуцентов моноклонального антитела в рамках концепции «Качество при разработке» («Quality by design», QbD) с применением минибиореакторов ambr15 (TAP Biosystems).

Ключевые слова: Quality by Design (QbD), характеристика процесса, демасштабированная модель, минибиореактор.

Характеристика процесса культивирования – важнейший этап разработки производственного процесса получения терапевтических белков в рамках международной концепции «Качество через разработку» или по-другому «Проектирование качества» («Quality by Design»). В работе показано практическое применение системного подхода по характеристике периодического процесса культивирования с подпиткой (fed-batch) для обеспечения требуемого качества гуманизированного моноклонального антитела (мАТ) к C5-компоненту комплемента человека с применением высокопроизводительной системы минибиореакторов ambr15. В начале изучены массобменные и технические характеристики минибиореактора ambr15 с рабочим объёмом культуральной жидкости 15 мл и на его базе разработана и квалифицирована демасштабированная модель промышленного биореактора (ДММ). С помощью ДММ изучили влияние потенциальных критических параметров процесса (potential critical process parameters, pCPP) на критические показатели качества мАТ (critical quality attribute, CQA) и ключевые показатели процесса (key process attribute, KPA). В рамках характеризуемого диапазона определены ключевые параметры процесса (KPP), а также критические параметры процесса со слабым воздействием (LI-CPP) и с сильным воздействием (HI-CPP) на CQA. Высокая устойчивость охарактеризованного процесса показана при проведении культивирования в условиях «худшего случая» («worst case», при выходе HI-CPP за границу рабочего диапазона) с применением квалифицированной демасштабированной модели в лабораторном биореакторе Biostat B с рабочим объём 1,5 л (модель разработана и квалифицирована ранее). Показано, использование демасштабированной модели на базе минибиореакторов ambr15 на этапе характеристики процесса в рамках концепции QbD позволяет оценить приемлемость рабочих диапазонов параметров культивирования для получения целевого продукта требуемого качества с возможностью непосредственного масштабирования процесса до промышленного объёма.

Литература

1. *ICH Harmonised Tripartite Guideline. Pharmaceutical development Q8 (R2). 2009.*
2. *ICH Harmonised Tripartite Guideline. Development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities) Q11. 2012.*
3. *Group C.B.W. A-MAb: a case study in bioprocess development. Emeryville, CA: CASSS, 2009.*
4. *Janakiraman V., Kwiatkowski C., Kshirsagar R., Ryll T., Huang Y.M. Application of high-throughput mini-bioreactor system for systematic scale-down modeling, process characterization, and control strategy development // Biotechnology progress. 2015. Vol. 31, No. 6. P. 1623-1632.*
5. *Li F., Hashimura Y., Pendleton R., Harms J., Collins E., Lee B. A systematic approach for scale-down model development and characterization of commercial cell culture processes // Biotechnology progress. 2006. Vol. 22. No. 3. P. 696-703.*
6. *Seely R. J., Haury J. Applications of failure modes and effects analysis to biotechnology manufacturing processes // Biotechnology and bioprocessing series. – 2005. – Vol. 29.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-180-181

APPLICATION OF AMBR15 MINIBIOREACTORS IN CHARACTERIZATION OF SUSPENSION MONOCLONAL ANTIBODY CHO-PRODUCER CELL CULTURE PROCESS BASED ON QBD PRINCIPLES

Zakharov Z.V., Morozov A.N., Yakhin I.R.

JSC «Generium», Vladimir region, Vol'ginskiy village, Russia
601125, Vladimir region, Vol'ginskiy village, Vladimirskaya street, 14
e-mail: zakharov@ibcgenerium.ru

A systematic approach to characterizing the cell culture process of CHO-producers of monoclonal antibodies within the framework of the concept "Quality by design" (QbD) with the use of ambr15 mini-bioreactors (TAP Biosystems) is shown.

Ключевые слова: Quality by Design (QbD), process characterization, scale-down model, minibioreactor.

Cell culture process characterization is very important stage in the development of process production of therapeutic proteins within the international concept "Quality by Design". The study demonstrates the practical application of a systematic approach to characterization of a fed-batch cell culture process to ensure the required quality of a humanized monoclonal antibody (mAb) to the C5 component of human complement using a high-performance ambr15 mini-bioreactor system. At the beginning, the mass transfer and technical characteristics of the ambr15 minibioreactor with a working volume of the culture liquid of 15 ml were studied, and a scaled-down model of an industrial bioreactor (SDM) was developed and qualified based on it. By SDM, we studied the influence of potential critical process parameters (pCPP) on critical quality attributes (CQA) and key process attributes (KPA). Within the characterized range, the key process parameters (KPP) and the critical process parameters with low impact (LI-CPP) and with high impact (HI-CPP) on the CQA are determined. The high stability of the characterized process is shown in the "worst case" cultivation (HI-CPP was beyond the working range) using a qualified scaled-down model in a laboratory bioreactor Biostat B with a working volume of 1.5 liters (the model is developed and qualified earlier). It is shown that the use of a scale-down model based on ambr15 minibioreactors at the process characterization stage within the QbD concept makes it possible to assess the acceptability of cell culture parameters operating ranges to obtain a target product within required quality with the possibility of direct scaling-up of the process to industrial volume.

References

1. *ICH Harmonised Tripartite Guideline. Pharmaceutical development Q8 (R2). 2009.*
2. *ICH Harmonised Tripartite Guideline. Development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities) Q11. 2012.*
3. *Group C.B.W. A-MAb: a case study in bioprocess development. Emeryville, CA: CASSS, 2009.*
4. *Janakiraman V., Kwiatkowski C., Kshirsagar R., Ryll T., Huang Y.M. Application of high-throughput mini-bioreactor system for systematic scale-down modeling, process characterization, and control strategy development // Biotechnology progress. 2015. Vol. 31, No. 6. P. 1623-1632.*
5. *Li F., Hashimura Y., Pendleton R., Harms J., Collins E., Lee B. A systematic approach for scale-down model development and characterization of commercial cell culture processes // Biotechnology progress. 2006. Vol. 22. No. 3. P. 696-703.*
6. *Seely R. J., Haury J. Applications of failure modes and effects analysis to biotechnology manufacturing processes // Biotechnology and bioprocessing series. – 2005. – Vol. 29.*

УДК: 606, ББК: 28.087.1 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-182-183

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НАБОРА ДЛЯ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ SARS-COV-2

А.С. Курочкина

Высшая школа биотехнологии и пищевых производств. Институт биомедицинских систем и биотехнологий. Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Россия, 194021, Санкт-Петербург, Новороссийская, 48, anny-nice@mail.ru, 89533760008

Представлены характеристики диагностического набора для выявления коронавирусной инфекции. Определена диагностическая чувствительность данного набора на выборке из 130 образцов путём сравнения с результатами, полученными при использовании референтного набора.

Ключевые слова: ПЦР, аналитическая чувствительность, коронавирусная инфекция, лабораторная диагностика

В связи с возникновением новой коронавирусной инфекции *SARS-CoV-2*, возникла необходимость в определении вирусной РНК в клинических образцах. С этой целью в компании Алкор-Био был создан набор для ПЦР-диагностики коронавирусной инфекции «Интифика *SARS-CoV-2*», основанный на определении содержания вирусной РНК в мазках из ротоглотки и носоглотки пациентов. Принцип действия набора реагентов «Интифика *SARS-CoV-2*» основан на методе мультиплексной ПЦР в режиме реального времени с реакцией обратной транскрипции для выявления специфичных участков-мишеней РНК-генома коронавируса *SARS-CoV-2*. РНК выделяется из биологического материала (мазков из ротоглотки и носоглотки) в выделительной зоне лаборатории и проводится реакция ПЦР в реальном времени. На первом этапе на матрице, выделенной РНК с помощью фермента обратной транскриптазы нарабатываются фрагменты кДНК, которые служат матрицей для последующей амплификации и детекции. На втором этапе ПЦР в процессе амплификации с использованием мишень-специфичных праймеров происходит накопление фрагментов ДНК мишеней, с которыми, в свою очередь, гибридизуются мишень-специфичные флуоресцентно-меченные олигонуклеотидные зонды. В ходе реакции происходит расщепление зондов с высвобождением флуорофора, фиксируемое прибором как возрастание интенсивности флуоресцентного сигнала в режиме реального времени. После завершения реакции происходит анализ полученных кривых и значений их характеристических точек, на основании которых интерпретируются результаты.

Диагностическая чувствительность тест-системы определена на выборке из 130 образцов мазков из носоглотки и ротоглотки, положительных на *SARS-CoV-2*, и составляет метода 98,3 % (с вероятностью 95 % диагностическая чувствительность находится в диапазоне 95 – 98,3 %). В качестве референтного метода использовался набор для качественного анализа РНК *SARS-CoV-2* «*SARS-CoV-2-SARS-CoV*», производства компании «ДНК-Технология». Анализ полученных диагностических характеристик относительно характеристик, которые дает референтный метод, представлен в таблице 1.

Таблица 1 - Анализ диагностических характеристик относительно референтного метода.

Набор / Результат	«Интифика *SARS-CoV-2*»	ДНК-Технология «*SARS-CoV-2-SARS-CoV*»
Положительный результат	130	130
Отрицательный результат	0	0
Всего проб	130	

Выводы. Полученное значение характеристики соответствует заявленному значению в технических требованиях. Значение диагностической чувствительности составляет 98.3%, оно было получено путем сравнения с референтным методом. Дискордантных результатов не обнаружено.

Литература

1. *Никонова А.А. Выявление и идентификация респираторных вирусов методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени: дисс. канд. биологических наук. М., 2008. 141 с. 2. Потапова Н.И. разработка тест-систем на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени для диагностики туберкулеза: дисс. канд. биологических наук. М., 2006. 163 с.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-182-183

DETERMINATION OF THE DIAGNOSTIC SENSITIVITY OF THE KIT FOR PCR DIAGNOSTICS OF CORONA VIRUS INFECTION SARS-COV-2

A.Kurochkina

Higher School of Biotechnology and Food Production. Institute of Biomedical Systems and Biotechnologies. Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University. , Россия, 194021, Saint-Petersburg, Novorossiyskaya, 48

The characteristics of a diagnostic kit for detecting coronavirus infection are presented. The diagnostic sensitivity of this set was determined on a selection of 130 samples by comparing it with the results obtained using the reference set.

Key words: PCR, diagnostic sensitivity, corona virus infection, laboratory diagnostics

Due to the emergence of a new coronavirus infection *SARS-CoV-2*, there was a need to determine the viral RNA in clinical samples. For this purpose, the company Alkor-Bio has created a set for PCR diagnostics of coronavirus infection "Intifica *SARS-CoV-2*", based on the determination of the content of viral RNA in swabs from the oropharynx and nasopharynx of patients. The principle of operation of the set of reagents "Intifica *SARS-CoV-2*" is based on the method of multiplex PCR in real time with a reverse transcription reaction to identify specific target sites of the RNA genome of the *SARS-CoV-2* coronavirus. RNA is isolated from biological material (swabs from the oropharynx and nasopharynx) in the excretory zone of the laboratory and a real-time PCR reaction is performed, at the first stage of which cDNA fragments are produced on the matrix of the isolated RNA using the reverse transcriptase enzyme, which serve as a matrix for subsequent amplification and detection. At the second stage of PCR, during amplification using target-specific primers, the accumulation of target DNA fragments occurs, with which, in turn, target-specific fluorescently labeled oligonucleotide probes are hybridized.During the reaction, the probes are split with the release of a fluorophore, which is recorded by the device as an increase of the intensity of the fluorescent signal in real time. After the reaction is completed, the obtained curves and the values of their characteristic points are analyzed, on the basis of which the results are interpreted.

The diagnostic sensitivity of the test system was determined on a selection of 130 samples of nasopharyngeal and oropharyngeal swabs positive for *SARS-CoV-2* and is 98.3% relative to the reference method (with a 95% probability, the diagnostic sensitivity is in the range of 95-98.3 %). As a reference method, a set for qualitative analysis of *SARS-CoV-2* RNA "*SARS-CoV-2-SARS-CoV*", manufactured by DNA-Technology, was used.

The analysis of the obtained diagnostic characteristics relative to the characteristics that the reference method gives is presented in Table 1.

Table 1- Analysis of diagnostic characteristics relative to the reference method.

Kit / Result	«Intifica *SARS-CoV-2*»	DNA-Technology «*SARS-CoV-2-SARS-CoV*»
Positive result	130	130
Negative result	0	0
Total number of samples	130	

Conclusions. The obtained value of the characteristic corresponds to the declared value in the technical requirements. The diagnostic sensitivity value is 98.3%, it was obtained by comparison with the reference method. No discordant results were found.

References

1. *Nikonova A. A. Detection and identification of respiratory viruses by multiplex PCR with real-time detection: diss. cand. biological sciences. M., 2008. 141 p. 2. Potapova N. I. development of test systems based on polymerase chain reaction (PCR) in real time for the diagnosis of tuberculosis: diss. cand. biological sciences. M., 2006. 163 p.*

ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И МЕДИЦИНЫ

INNOVATION TECHNOLOGIES AND EQUIPMENT FOR PHARMACEUTICAL INDUSTRY AND MEDICINE

1. СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ ЭКСТРАКЦИЯ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
Казеев И.В., Худеев И.И., Артемьев А.И., Бочарова О.А. 185

SUPERCRITICAL EXTRACTION FOR THE ISOLATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES
Kazeev I.V., Khudeev I.I., Artemiev A.I., Bocharova O.A. 186

2. УСТРОЙСТВА POINT-OF-CARE (POC) – НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ В БИОМЕДИЦИНСКОМ ПРИБОРОСТРОЕНИИ
Зубик А.Н., Рудницкая Г.Е., Лукашенко Т.А., Евстрапов А.А. 187

POINT-OF-CARE (POC) DEVICES – A NEW TREND IN BIOMEDICAL DEVICE
Zubik A.N., Rudnitskaya G.E., Lukashenko T.A., Evstrapov A.A. 188

3. ПУТИ УЛУЧШЕНИЯ ТРАДИЦИОННОЙ ТЕХНОЛОГИИ СОРБЦИОННОЙ ОЧИСТКИ КОКАРБОКСИЛАЗЫ
Красовицкая И.А., Котова Н.В., Кованёва А.В., Холодаева С.В., Пятиизбянцев Т.А. 189

WAYS TO IMPROVE THE TRADITIONAL COCARBOXYLASE SORPTION PURIFICATION TECHNOLOGY
Krasovitskaya I.A., Kotova N.V., Kovaneva A.V., Kholodaeva S.V., Pyatiizbyantsev T.A. 190

УДК: 66.083.3; 66.061.3 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-185-187

СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ ЭКСТРАКЦИЯ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Казеев И.В., Худеев И.И., Артемьев А.И., Бочарова О.А.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
ул. Героев Панфиловцев, 20, Москва, Российская Федерация, 125480.
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
Каширское шоссе, 24, Москва, Российская Федерация, 115478.
E-mail: illarionkhudeev@mail.ru

В работе представлено развивающееся направление сверхкритической экстракции (СКЭ), которое открывает новые перспективы по извлечению биологически активных веществ из растительного сырья. Ведутся исследования по получению активных биологических веществ для лечения социально значимых заболеваний.

Ключевые слова: сверхкритические технологии, сверхкритическая экстракция, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, аралозиды, фитоадаптогены.

Актуальной задачей химической промышленности в рамках Индустрии 4.0 является развитие инновационных биотехнологических процессов. Внедрение таких процессов позволяет обрабатывать и получать новые качественные материалы и вещества. Кроме того, инновационные технологии должны соответствовать принципам «зеленой химии». Одна из таких технологий – СКЭ.

Проведение процесса СКЭ требует специального оборудования высокого давления. Процесс извлечения целевых компонентов проводили на установке с экстрактором объемом 250 мл [1]. Принципиальная схема установки представлена на рисунке 1. Процесс проводили при температуре 313 К, давлении 120 бар, расходе диоксида углерода 100 г/ч в течении 3 ч. Процесс СКЭ схематично представлен на рисунке 2.

В ходе процесса СКЭ диоксид углерода проходит через слой частиц растительного сырья, проникает в межклеточное пространство и затем внутрь клеток. Целевые компоненты, находящиеся внутри клеток сырья, растворяются в сверхкритическом диоксиде углерода и затем извлекаются.

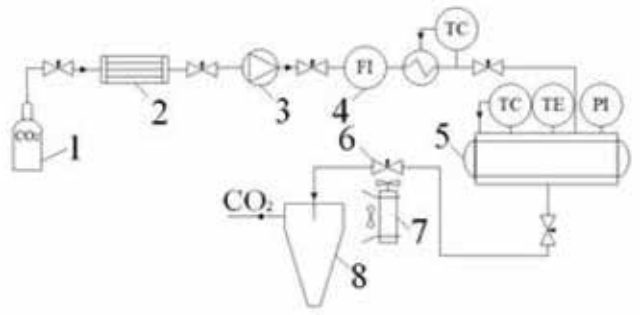


Рисунок 1 – Принципиальная схема установки для проведения процесса сверхкритической экстракции:
1 – баллон диоксида углерода (60 бар); 2 – конденсатор;
3 – насос; 4 – теплообменник; 5 – экстрактор объемом 250 мл;
6 – регулятор давления; 7 – нагревательный элемент;
8 – сепаратор; TC – регулятор температуры; TE – преобразователь термоэлектрический; FI – Кориолисовый расходомер; PI – датчик давления

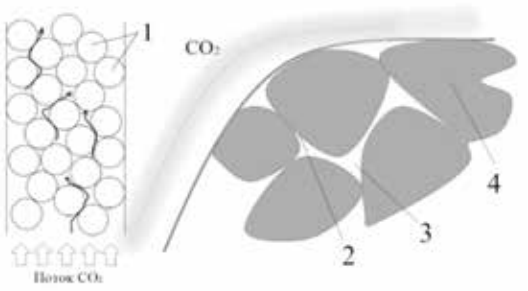


Рисунок 2 – Схематичное представление процесса сверхкритической экстракции из растительного сырья:
1 – частица растительного сырья; 2 – граница клетки;
3 – межклеточное пространство; 4 – клетка

С применеим процесса СКЭ были получены экстракты из аралии маньчжурской, женьшеня и якорцев стелящихся. Экстракты были проанализированы с помощью разработанных методик ВЭЖХ-МС. Проведено сравнение состава экстрактов, полученных методом СКЭ и жидкостной экстракции. Установлено что содержание целевых компонентов в экстрактах, полученных методом СКЭ выше, чем в экстрактах, полученных жидкостной экстракцией. Таким образом, процесс СКЭ является перспективным методом извлечения биологически активынх веществ.

Данные исследования нацелены на разработку технологии получения компонентов экстрактов фитоадаптогенов, обладающих противоопухолевой активностью, с применением процесса СКЭ.

Литература

1. Меньшутина Н.В., Казеев И.В., Артемьев А.И., Бочарова О.А., Худеев И.И. применение сверхкритической экстракции для выделения химических соединений// Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология. – 2021. – Т. 64. – №. 6. – С. 4-19.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-185-187

SUPERCRITICAL EXTRACTION FOR THE ISOLATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Kazeev I.V., Khudeev I.I., Artemiev A.I., Bocharova O.A.

International Science and Education Center for Transfer of Biopharmaceutical Technologies, Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Geroev Panfilovtsev st., 20, Moscow, 125480, Russia
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Kashirskoe shosse, 24, Moscow, 115478, Russia
E-mail: illarionkhudeev@mail.ru

The paper presents the developing direction of supercritical extraction (SCE), which opens up new prospects for the extraction of biologically active substances from plant raw materials. Research is underway to obtain active biological substances for the treatment of socially significant diseases.

Key words: supercritical technologies, supercritical extraction, high performance liquid chromatography, mass spectrometry, aralosides, phytoadaptogens.

The urgent task of the chemical industry in the framework of Industry 4.0 is the development of innovative biotechnological processes. The introduction of such processes makes it possible to process and obtain new high-quality materials and substances. In addition, innovative technologies must comply with the principles of "green chemistry". One of these technologies is SCE.

Carrying out the SCE process requires special high-pressure equipment. The process of extracting the target components was carried out on a unit with an extractor with a volume of 250 ml [1]. A schematic diagram of the installation is shown in Figure 1. The process was carried out at a temperature of 313 K, a pressure of 120 bar, a carbon dioxide flow rate of 100 g / h for 3 hours. The SCE process schematically shows in Figure 2.

During the SCE process, carbon dioxide passes through the layer of plant material particles, penetrates into the intercellular space and then into the cells. The target components inside the cells of the raw material are dissolved in supercritical carbon dioxide and then extracted.

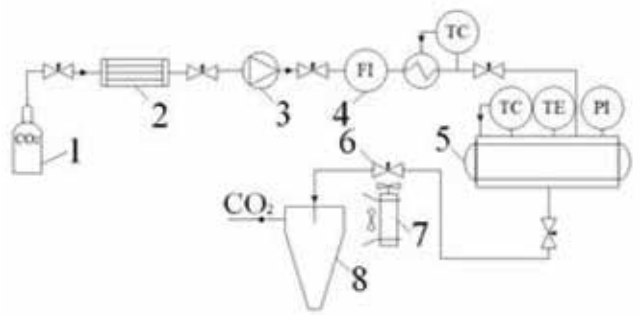


Figure 1. Schematic diagram of the installation for the supercritical extraction process: 1 – carbon dioxide cylinder (60 bar); 2 – condenser; 3 – pump; 4 – heat exchanger; 5 – extractor with a volume of 250 ml; 6 – pressure regulator; 7 – heating element; 8 – separator; TC – temperature controller; TE – thermocouple; FI – coriolis flow meter; PI – pressure sensor

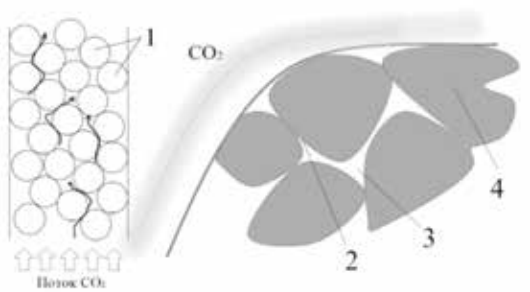


Figure 2. Scheme of the supercritical extraction process from plant raw materials: 1 – particle of plant materials; 2 – cell border; 3 – intercellular space; 4 – cell

Using the SCE process, extracts from Manchurian aralia, ginseng and creeping tribulus were obtained. The extracts were analyzed using the developed HPLC-MS methods. Comparison of the composition of extracts obtained by the method of SCE and liquid extraction is carried out. It was found that the content of the target components in the extracts obtained by the SCE method is higher than in the extracts obtained by liquid extraction. Thus, the SCE process is a promising method for the extraction of biologically active substances.

These studies are aimed at developing a technology for obtaining components of phytoadaptogen extracts with antitumor activity using the SCE process.

References

1. *Menshutina N.V., Kazeev I.V., Artemiev A.I., Bocharova O.A., Khudeev I.I. Application of supercritical extraction for isolation of chemical compounds. ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]. 2021. V. 64. N 6. P. 4-19*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-187-189

УСТРОЙСТВА POINT-OF-CARE (POC) – НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ В БИОМЕДИЦИНСКОМ ПРИБОРОСТРОЕНИИ

Зубик А.Н., Рудницкая Г.Е., Лукашенко Т.А., Евстрапов А.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
190103, Санкт-Петербург, Рижский пр., 26
e-mail: Зубик А.Н. <tunix@yandex.ru>

Сконструированы и протестированы микрочиповые устройства из стекла, кремния, полимерных материалов для использования в диагностических системах Point-of-Care биомедицинского назначения.

Ключевые слова: микрофлюидика; микрочип; Point-of-Care (POC).

Новым и актуальным направлением в биомедицинском приборостроении является разработка надежных, автономных портативных устройств для диагностики на месте события и полевых анализов (POC, Point-of-Care). Прогнозируется, что к 2026 году мировой рынок диагностики POC достигнет 28 379,6 млн $ [1]. Инструменты POC являются основой для персонализированной медицины вне больниц, позволят снизить затраты на здравоохранение и сделать деятельность медицинских учреждений более гибкой и безопасной, например, привести к уменьшению нагрузки клинических лабораторий, что снизит риски получения ошибок в результатах анализов. С помощью приборов POC для диагностики и тестов на местах возможно решение важных социальных проблем в области охраны здоровья человека и окружающей среды. Конструирование и создание таких инструментов требуют развития нанотехнологии, нано- и микроэлектроники, фотоники, биотехнологии, материаловедения. Микрофлюидика обеспечивает точный контроль объемов и скоростей потоков образцов и реагентов, что позволяет разделять и обнаруживать целевые аналиты с высокой специфичностью и чувствительностью в пробах небольшого объема. Инструменты POC на основе микрофлюидных технологий имеют ряд преимуществ таких, как простота использования, низкий расход реагентов, малое время отклика, отсутствие необходимости в специализированном оборудовании и возможность непрерывного мониторинга интересующих аналитов [2].

Микрофлюидные чипы являются ключевым элементом устройств POC. В ИАП РАН разработаны, изготовлены и протестированы микрочиповые устройства (рис. 1) из различных материалов: кремния, стекла, термопластиков и эластомеров, – для проведения реакций амплификации (полимеразной цепной реакции и изотермической амплификации, рис. 1.3), микрочиповые устройства на основе капельной микрофлюидики (рис. 1.2), микрофлюидные чипы с «ловушками» для исследований отдельных клеток (рис. 1.1 и 1.4), для лизиса и выделения нуклеиновых кислот (рис. 1.5), для секвенатора (рис. 1.6) и микрофлюидный чип с наноканалами (рис. 1.7). Выбор подходящего материала с различными химическими свойствами, поверхностными свойствами, теплопроводностью и электропроводностью очень важен и зависит от конкретного применения микрочипа.

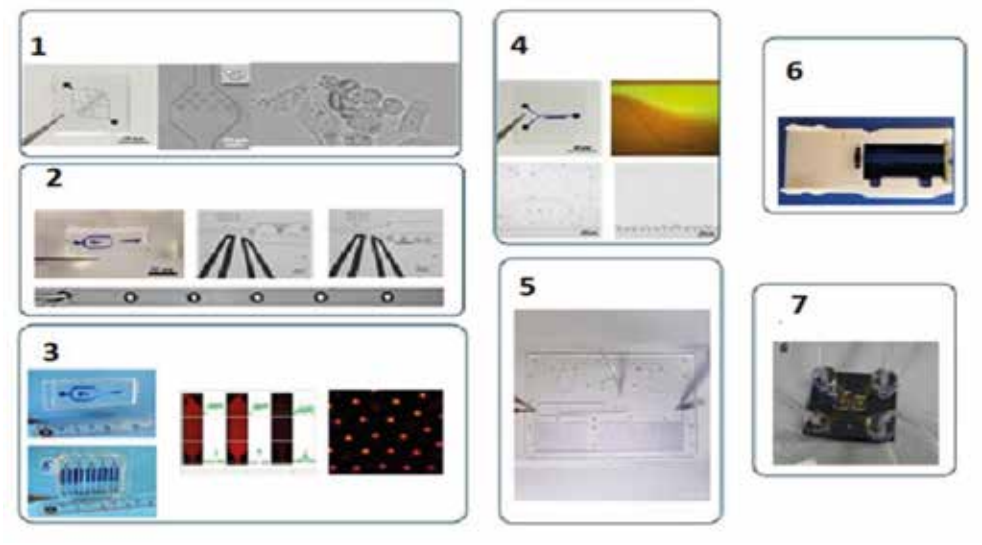


Рисунок 1 – Разработанные в ИАП РАН микрочиповые устройства

Литература

[1] Kumar S., Nehra M., Khurana S., et al. Aspects of point-of-care diagnostics for personalized health wellness // Int. J. Nanomedicine. 2021. Vol. 16. P. 383–402. doi 10.2147/IJN.S267212

[2] Pandey C.M., Augustine S., Kumar S., et al. Microfluidics based point-of-care diagnostics // J. Biotechnol. 2018. Vol. 13, № 1. doi 10.1002/biot.201700047

UDC 57.088.1 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-187-189

POINT-OF-CARE (POC) DEVICES – A NEW TREND IN BIOMEDICAL DEVICE

Zubik A.N., Rudnitskaya G.E., Lukashenko T.A., Evstrapov A.A.

Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia
190103, St. Petersburg, Rizhsky pr., 26
e-mail: Zubik A.N. <tunix@yandex.ru>

Microchip devices made of glass, silicon, polymeric materials have been designed and tested for use in Point-of-Care diagnostic systems for biomedical purposes.

Key words: microfluidics; microchip; Point-of-Care (POC).

A new and relevant trend in biomedical instrumentation is the development of reliable, self-contained portable devices for on-site diagnostics and field analysis (POC, Point-of-Care). It is predicted that by 2026 the global POC diagnostics market will reach $ 28,379.6 million [1]. POC tools are the foundation for personalized medicine outside of hospitals, helping to reduce healthcare costs and make healthcare facilities more flexible and safer, for example, reduce the workload of clinical laboratories, which will reduce the risk of errors in test results. POC instruments for diagnostics and on-site testing can solve important social problems in the field of human health and the environment. The design and creation of such instruments require the development of nanotechnology, nano- and microelectronics, photonics, biotechnology, and materials science. Microfluidics provides precise control of sample and reagent volumes and flow rates, allowing for the separation and detection of target analytes with high specificity and sensitivity in small sample volumes. POC instruments based on microfluidic technologies have a number of advantages, such as ease of use, low reagent consumption, fast response time, no need for specialized equipment, and the ability to continuously monitor analytes of interest [2].

Microfluidic chips are a key element of POC devices. In the IAP RAS it has developed, manufactured and tested microchip devices (fig. 1) from various materials: silicon, glass, thermoplastics and elastomers, for carrying out

amplification reactions (polymerase chain reaction and isothermal amplification, fig. 1.3), microchip devices based on drop microfluidics (fig. 1.2), microfluidic chips with "traps" for studies of individual cells (fig. 1.1 and 1.4), for lysis and isolation of nucleic acids (fig. 1.5), for a sequencer (fig. 1.6) and a microfluidic chip with nanochannels (fig. 1.7). The selection of a suitable material with different chemical properties, surface properties, thermal conductivity and electrical conductivity is very important and depends on the specific application of the microchip.

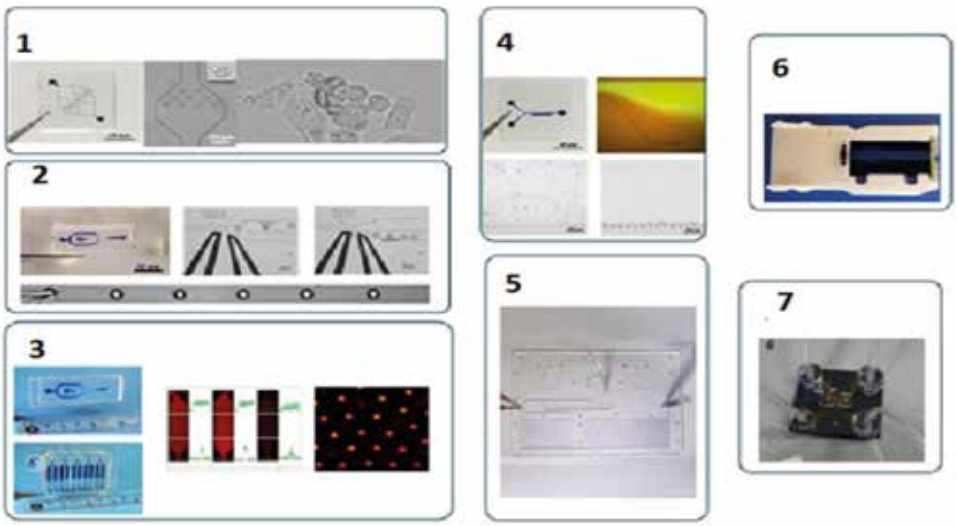


Figure 1. Microchip devices developed at the IAP RAS

References

[1] Kumar S., Nehra M., Khurana S., et al. Aspects of point-of-care diagnostics for personalized health wellness // Int. J. Nanomedicine. 2021. Vol. 16. P. 383–402. doi 10.2147/IJN.S267212

[2] Pandey C.M., Augustine S., Kumar S., et al. Microfluidics based point-of-care diagnostics // J. Biotechnol. 2018. Vol. 13, № 1. doi 10.1002/biot.20170004

УДК 606:577.151.5 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-189-191

ПУТИ УЛУЧШЕНИЯ ТРАДИЦИОННОЙ ТЕХНОЛОГИИ СОРБЦИОННОЙ ОЧИСТКИ КОКАРБОКСИЛАЗЫ

Красовицкая И.А., Котова Н.В., Кованёва А.В., Холодаева С.В., Пятиизбянцев Т.А.

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14
e-mail: Krasovizkaya.Irina@pharminnotech.com

В работе представлены результаты экспериментов по изучению процесса сорбции кокарбоксилазы из модельного раствора в статических и динамических условиях на сорбентах различной структуры. Подобран сорбент для разработки сорбционно-хроматографического метода выделения кокарбоксилазы из смеси эфиров тиамина.

Ключевые слова: кокарбоксилаза, тиаминдифосфат, сорбент, сорбция, катионит

Кокарбоксилаза (тиаминдифосфат, ТДФ) – органическое гетероциклическое соединение, активная форма витамина B_1. Кокарбоксилаза является составной частью нескольких ферментов, участвующих в промежуточном обмене веществ, её применяют в составе комплексной терапии при сахарном диабете, нарушениях сердечного ритма, недостаточности коронарного кровообращения, лёгких формах рассеянного склероза [1].

Традиционная технология кокарбоксилазы, неизменная с 70-х годов XX века, основана на химическом фосфорилировании витамина B1 с последующим разделением смеси эфиров тиамина на сульфокатионите КУ-23 [2]. Сорбент КУ-23 в настоящее время не выпускается в промышленных масштабах на территории Российской Федерации, и его поставки на территорию страны затруднены. В связи с тем, что на Российском рынке представлено большое разнообразие современных сорбентов, перспективным является поиск замены труднодоступному КУ-23.

Целью данной работы являлось изучение процесса сорбции кокарбоксилазы на сорбентах различного типа для разработки сорбционно-хроматографического метода очистки.

В качестве объектов исследования использовали модельный раствор субстанции кокарбоксилазы гидрохлорида, полученной на предприятии ООО «Компания «ДЕКО», и следующие сорбенты: макропористые сульфокатиониты КУ-23, Purolite C-115E, Doshion DVC-8 UPS, Dowex Marathon C, Purolite C400 MB, Amberlite HPR1100, Purolite C150H, Purolite C160H), катиониты гелевой структуры КБ-2, КБ-4П-2 (карбоксильные), КУ-2-8, КУ-2-20 (сульфокатиониты), молекулярный сверхсшитый сорбент Macronet MN-202 и хелатообразующий сорбент S950.

Изучены равновесные и кинетические параметры процесса сорбции ТДФ на вышеперечисленных сорбентах. Показано, что изотермы сорбции кокарбоксилазы имеют различный вид: Ленгмюра, БЭТ и кооперативная. Наибольшей ёмкостью и избирательностью обладает сорбент Amberlite HPR1100 (соответственно 1420,24 ± 71,0 мг/мл и Kd = 156,95 ± 0,5 мл/г), коэффициент диффузии при этом составил $1,4 \pm 0,2 \times 10^{-6}$ м^2/с.

Изучение процесса сорбции и десорбции кокарбоксилазы на исследуемых сорбентах в динамических условиях проводилось на лабораторной колонке диаметром 10 мм при высоте слоя сорбента 10 мм, скорости пропускания раствора 0.75 мл/мин при сорбции и 0.375 мл/мин при десорбции.

Установлено, что процесс сорбции осуществляется с выходом 70 %, однако использование традиционного элюента (буферный раствор ацетата аммония pH = 5,5) при десорбции не дало значительных результатов. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости подбора более эффективного элюента с добавлением органических растворителей.

Таким образом, макропористый сульфокатионит Amberlite HPR1100 может быть использован для разработки сорбционно-хроматографического метода выделения кокарбоксилазы из смеси эфиров тиамина.

Литература

1. *Большая советская энциклопедия [Электронный ресурс]. – Электронная энциклопедия. – Режим доступа: http://bse.sci-lib.com/article062606.html*
2. *Поляченко В. М., Юркевич А. М., Махкамов Х. М., Леонтьева Л. И., Ядгаров Э. Г. Способ получения фосфорных эфиров тиамина // Патент РФ № 2041229, 09.08.1995*

UDC 606:577.151.5 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-189-191

WAYS TO IMPROVE THE TRADITIONAL COCARBOXYLASE SORPTION PURIFICATION TECHNOLOGY

Krasovitskaya I.A., Kotova N.V., Kovaneva A.V., Kholodaeva S.V., Pyatiizbyantsev T.A.

Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, Russia
14, Prof. Popov St., Saint-Petersburg, 197376, Russian federation
e-mail: Krasovizkaya.Irina@pharminnotech.com

This work presents the results of experiments of cocarboxylase sorption from a model solution on sorbents of various structures under static and dynamic conditions. The sorbent was selected for the development of a sorption-chromatographic method for the isolation of cocarboxylase from a mixture of thiamine esters.

Key words: cocarboxylase, thiamine diphosphate, sorbent, sorption, cation exchanger

Cocarboxylase (thiamine diphosphate, TDF) is an organic heterocyclic compound, the active form of vitamin B_1. Cocarboxylase is an integral part of several enzymes involved in intermediate metabolism; it is used as part of complex therapy for diabetes mellitus, heart rhythm disturbances, coronary circulation insufficiency and mild forms of multiple sclerosis [1].

The traditional technology of cocarboxylase have been unchanged since the 70s of the XX century. It is based on chemical phosphorylation of vitamin B1 with subsequent separation of thiamine esters mixture on sulfonic cation exchanger KU-23 [2]. Sorbent KU-23 is currently not produced on an industrial scale in the territory of the Russian Federation, and its supply to the country is difficult. Due to the fact that a wide variety of modern sorbents is presented on the Russian market, it is promising to find a replacement for the hard-to-reach KU-23.

The aim of this work was to study the process of cocarboxylase sorption on various types of sorbents for the sorption-chromatographic purification method development.

As objects we used a model solution of the hydrochloride cocarboxylase substance obtained at the company «DEKO», and the following sorbents: macroporous sulfonic cation exchangers KU-23, Purolite C-115E, Doshion DVC-8 UPS, Dowex Marathon C, Purolite C400 MB, Amberlite HPR1100, Purolite C150H, Purolite C160H), gel structure cation exchangers KB-2, KB-4P-2 (carboxyl), KU-2-8, KU-2-20 (sulfonic cation exchangers), molecular hypercrosslinked sorbent Macronet MN-202 and chelating sorbent S950.

The equilibrium and kinetic parameters of the TDF sorption process on these sorbents were studied.

The sorption isotherms of cocarboxylase have different forms: Langmuir, BET and cooperative. The highest capacity and selectivity is possessed by the Amberlite HPR1100 sorbent (respectively 1420.24 ± 71.0 mg/ml and Kd = 156.95 ± 0.5 ml/g), the diffusion coefficient was $1.4 \pm 0.2 \times 10^{-6}$ m^2/s.

The study of cocarboxylase dynamic sorption and desorption on the considered sorbents was carried out on a laboratory column 10 mm in diameter with a sorbent layer height of 10 mm, a solution flow rate of 0.75 ml/min during sorption and 0.375 ml/min during desorption.

It was found that the sorption process is carried out with a yield 70%, however, the use of a traditional eluent (buffer solution of ammonium acetate pH = 5.5) during desorption did not give significant results. The results obtained indicate the need of a more efficient eluent with the addition of organic solvents selection.

Thus, the macroporous sulfonic cation exchanger Amberlite HPR1100 can be used to develop a sorption-chromatographic method of cocarboxylase isolation from a mixture of thiamine esters.

References

1. *Great Soviet Encyclopedia [Electronic resource]. - Electronic encyclopedia. - Access mode: http://bse.sci-lib.com/article062606.html*
2. *Polyachenko V.M., Yurkevich A.M., Makhkamov Kh.M., Leontyeva L.I., Yadgarov E.G. The obtaining of thiamine phosphoric esters method // RF Patent No. 2041229, 09.08.1995*

ОТ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ К ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЕ

FROM CELL TECHNOLOGIES TO PERSONALIZED MEDICINE

1. РЕКОНСТРУКЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЭКВИВАЛЕНТОВ КОЖИ С ИПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНЫХ И ТКАНЕВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
Калабушева Е.П., Роговая О.С., Чермных Э.С., Осидак Е.О., Киселева Е.В., Риппа А.Л., Рябинин А.А., Бейлин А.К., Гурская Н.Г., Воротеляк Е.А. 193

RECONSTRUCTION OF FUNCTIONAL EQUIVALENTS OF THE SKIN USING CELL AND TISSUE TECHNOLOGIES
Kalabusheva E.P., Rogovaya O.S., Chermnykh E.S., Osidak E.O., Kiseleva E.V., Rippa A.L., Ryabinin A.A., Beilin A.K., Gurskaya N.G., Vorotelyak E.A. 193

2. МАГНИТНАЯ СЕЛЕКЦИЯ ТРАНСДУЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВЫХ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЁРОВ
Полякова Н.С., Кандараков О.Ф., Брутер А.В., Петровская А.В., Белявский А.В. 194

MAGNETIC SELECTION OF TRANSDUCED CELLS USING NOVEL SURFACE MARKERS
Polyakova N.S., Kandarakov O.F., Bruter A.V., Petrovskaya A.V., Belyavsky A.V. 195

УДК 57.085.23 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-193-194

РЕКОНСТРУКЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЭКВИВАЛЕНТОВ КОЖИ С ИПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНЫХ И ТКАНЕВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Калабушева Е.П., Роговая О.С., Чермных Э.С., Осидак Е.О., Киселева Е.В., Риппа А.Л., Рябинин А.А., Бейлин А.К., Гурская Н.Г., Воротеляк Е.А.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия
119334, Москва, ул. Вавилова д.26
E-mail: kalabusheva.e@gmail.com

Ключевые слова: культура клеток кожи человека, волосяной фолликул, живой эквивалент кожи, буллезный эпидермолиз, регенеративная медицина

Кожа является одной из первых тканей, которые были успешно реконструированы in vitro и пересажены для лечения обширных дефектов при ранах и ожогах. Первая успешная работа по выделению и культивированию кератиноцитов кожи человека была проведена в 1975 году, и уже в 1981 году данная технология была адаптирована для медицинских целей и использована для закрытия ран у пациента с ожогами. На основе технологий культивирования клеток кожи нами разработаны для применения в медицинской практике многокомпонентные эквиваленты кожи. Данные эквиваленты могут быть основой для создания полноценных функциональных аналогов кожи, включающих железы и волосяные фолликулы. Реконструкция волосяных фолликулов основана на использовании специализированных клеток и их способности к самоорганизации и морфогенезу in vitro. Могут быть использованы как клетки из взрослых тканей, так и плюрипотентные клетки, дифференцированные в нужном направлении с использованием разработанных протоколов.

В основе работы – получение живого эквивалента кожи на основе трехмерного скаффолда, состоящего из коллагена I типа и других компонентов внеклеточного матрикса. В состав эквивалента входят дермальные и эпидермальные клетки, он значительно ускоряет и нормализует процесс заживления хронических ран. Живой эквивалент кожи является стартом для дальнейшего развития тканеинженерных конструкций-аналогов кожи и эквивалентов других тканей человека: в настоящее время в частности ведутся работы по изучению изучению стромальных фракций дермы для управления эпителио-мезенхимными взаимодействиями in vitro.

Отдельный блок работ посвящен реконструкции кожных дериватов – волосяных фолликулов – как из постнатальных клеток кожи, так и из линий клеток с индуцированной плюрипотентностью. Реконструкция функциональных, пригодных для трансплантации волосяных фолликулов – один из важнейших аспектов регенеративной дерматологии не только в качестве терапии заболеваний, ассоциированных с потерей волосяного покрова, но и в качестве перспективного стимулятора нормализации заживления хронических ран, в том числе и диабетических, развития сальных и потовых желез. Разработаны подходы по получению и трансплантации эквивалентов зачатков волосяных фолликулов, получены эквиваленты, содержащие фолликулярные органоиды, для которых показана способность развития в фолликулоподобные структуры. В настоящее время проводятся работы по получению модели для тестирования способности фолликулярных органоидов встраиваться и развиваться в человеческой коже – ксенотрансплантированной животным с иммунодефицитом.

Работа поддержана грантом РНФ № 21-74-30015.

UDC 57.085.23 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-193-194

RECONSTRUCTION OF FUNCTIONAL EQUIVALENTS OF THE SKIN USING CELL AND TISSUE TECHNOLOGIES

Kalabusheva E.P., Rogovaya O.S., Chermnykh E.S., Osidak E.O., Kiseleva E.V., Rippa A.L., Ryabinin A.A., Beilin A.K., Gurskaya N.G., Vorotelyak E.A.

Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119334, Moscow, Vavilova str. 26
E-mail: kalabusheva.e@gmail.com

Key words: Human skin cell culture, hair follicle, living skin equivalent, epidermolysis bullosa, regenerative medicine

Skin is one of the first tissues to be successfully reconstructed in vitro and transplanted to treat extensive defects in wounds and burns. The first successful isolation and cultivation of human skin keratinocytes was carried out in 1975 (Rheinwald, Green, 1975), and in 1981 this technology was adapted for medical purposes and used to close wounds in a patient with burns (O'Connor et al, 1981). Basing on skin cell culture technologies, we have developed multicomponent skin equivalents for use in medical practice. These equivalents can be the basis for the creation of complete functional skin analogs, including glands and hair follicles. Hair follicle reconstruction is based on the use of specialized cells and their ability to self-organize and support morphogenesis in vitro. Both cells from adult tissues and pluripotent cells differentiated in the required direction using the developed protocols.

The work is based on obtaining a living skin equivalent based on a three-dimensional scaffold consisting of type I collagen and other components of the extracellular matrix. The composition of the equivalent includes dermal and epidermal cells, it significantly accelerates and normalizes the healing process of chronic wounds. The living equivalent of the skin is a start for the further development of tissue-engineered constructs-analogs of skin and equivalents of other human tissues: at present, in particular, work is underway to study the stromal fractions of the dermis to control epithelial-mesenchymal interactions in vitro.

Another research topic is devoted to the reconstruction of skin derivatives - hair follicles - both from postnatal skin cells and from cell lines with induced pluripotency. Reconstruction of functional hair follicles suitable for transplantation is one of the most important aspects of regenerative dermatology, not only as a therapy for diseases associated with hair loss, but also as a promising stimulator for normalizing the healing of chronic wounds, including diabetic ones, and the development of sebaceous and sweat glands. Several approaches have been developed for obtaining and transplanting equivalents of hair follicle germs, equivalents containing follicular organoids have been obtained, for which the ability to develop into follicle-like structures has been shown. Currently, we are aimed at obtaining a model for testing the ability of follicular organoids to integrate and develop in human skin - xenografted to immunodeficient animals.

This work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 21-74-30015.

УДК 57.086.835, 602.1, 602.4 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-194-196

МАГНИТНАЯ СЕЛЕКЦИЯ ТРАНСДУЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВЫХ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЁРОВ

Полякова Н.С.[1], **Кандараков О.Ф.**[1], **Брутер А.В.**[1], **Петровская А.В.**[1], **Белявский А.В.**[1]

[1] *ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 32, стр. 1
e-mail: natae05@yandex.ru

Исследована возможность применения HA- и FLAG- тэгов в составе поверхностного белка CD52 для магнитного разделения трансдуцированных клеток *in vitro*. Показано, что эффективность селекции трансдуцированных линий клеток, как с одинарными, так и с бинарными тэгами, превышает 85%. Поверхностные маркёры на основе белка CD52, содержащие интегрированные HA- и FLAG- тэги, применимы для отбора клеток методом MACS.

Ключевые слова: HA tag, FLAG tag, EGFP, DsRed-Express2, MACS

Прогресс в экспериментальной клеточной биологии сегодня требует новые подходы к исследованию биологических объектов. Методы селекции клеток *in vitro*, а также критерии их отбора привлекают особое внимание [1-3]. Основными условиями при выборе методов селекции клеток являются чувствительность, чистота отбора и сохранение жизнеспособности отселектированных клеток.

Целью данные работы было исследование применимости разработанных ранее маркёров, содержащих HA- и FLAG-тэги, интегрированные в поверхностный белок CD52 [4], для магнитной селекции трансдуцированных клеток.

Объекты исследования – трансдуцированные NIH 3T3 клетки, конституитивно экспрессируюшие CD52/HA- и CD52/FLAG-селективные маркёры совместно с репортерными белками EGFP и DsRedEx2.

Культивирование клеток проводили в среде DMEM с 4,5 г/л глюкозы, с глутамином (ПанЭко), с добавлением 10%-ной эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone), 100 мкг/мл стрептомицина и 100 МЕ/мл пенициллина при 37оС и 5% CO_2.

Трансфекцию клеток HEK 293 бицистронными векторами осуществляли кальций-фосфатным методом. Через 24 часа после трансфекции вирусные супернатанты собрали и использовали для заражения клеток NIH 3T3. Для увеличения эффективности трансдукции в среду, содержащую вирусный супернатант, добавляли 16 мкг/мл полибрена (Sigma-Aldrich). Контрольный вариант NIH 3T3 трансдуцировали вектором MigR1, который выступал в качестве контрольного варианта при цитометрических измерениях.

Для сепарации трансдуцированных клеток использовали колонки LS (no. 130-042-401), конъюгированные супермагнитные шарики с моноклональными антителами µMACS DYKDDDDK isolation kit (no. 130-101—591) и µMACS HA isolation kit (no. 130-091-122) фирмы Miltenyi Biotec.

Трансдуцированные клетки снимали с помощью TrypLE Express (Gibco) при +37°C в течение 2-5 мин. Собранные клетки центрифугировали при 150×g, супернатант удаляли и клетки суспендировали в 5 мМ PBE буфере. Суспензию клеток смешивали с конъюгированными супермагнитными шариками и инкубировали при +4°C в течение 30 мин.

Разделение трансдуцированных клеток проводили на колонках LS, установленных на MACS магните (Miltenyi Biotec) после инкубации клеток с вышеуказанными конъюгированными магнитными шариками, следуя инструкциям фирмы производителя Miltenyi Biotec.

Цитометрический анализ проводили с помощью цитометра BDLSR Fortessa (BD USA) и программы Flowing Software.

В ходе исследования были получены трансдуцированные линии клеток с одинарными (HA-, FLAG-) и бинарными тэгами (HA/FLAG). Эффективность селекции клеток оценивали по экспрессии EGFP и DsRed-Exress2; во всех случаях селективность отбора в смеси тэг-позитивных и негативных клеток превышала 85%. Уменьшение количества конъюгированных с антителами шариков при магнитном разделении клеток повышало чистоту выделенной популяции клеток. Показана возможность магнитной селекции позитивной по двум тэгам популяции клеток. Полученные данные могут быть использованы при оптимизации методов очистки и разделения клеточных фракций, как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (РНФ, проект № 18-14-00300).

Авторы выражают благодарность Д. Мазурову, предоставившему плазмиды, содержащие CD52/HA- и CD52/FLAG-кодирующие последовательности.

Литература

1. *Plouffe BD, Murthy SK, Lewis LH. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review. Rep Prog Phys. 2015 78(1):016601.*
2. *Sutermaster BA , Darling EM. Considerations for high-yield, high-throughput cell enrichment: fluorescence versus magnetic sorting. Sci Rep. 2019 18; 9(1): 227.*
3. *Demin AM, Mekhaev AV, Kandarakov OF, Popenko VI, Leonova OG, Murzakaev AM, Kuznetsov DK, Uimin MA, Minin AS, Shur VY, Belyavsky AV, Krasnov VP. L-Lysine-modified Fe3O4 nanoparticles for magnetic cell labeling. Colloids Surf B Biointerfaces. 2020 190:110879.*
4. *Zotova A, Pichugin A, Atemasova A, Knyazhanskaya E, Lopatukhina E, Mitkin N, Holmuhamedov E, Gottikh M, Kuprash D, Filatov A, Mazurov D. Isolation of gene-edited cells via knock-in of short glycophosphatidylinositol-anchored epitope tags. Sci Rep. 2019 9(1):3132.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-194-196

MAGNETIC SELECTION OF TRANSDUCED CELLS USING NOVEL SURFACE MARKERS

Polyakova N.S.[1], **Kandarakov O.F.**[1], **Bruter A.V.**[1], **Petrovskaya A.V.**[1], **Belyavsky A.V.**[1]

[1] *Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*
119334, Moscow, Vavilova, 32, bld.1
e-mail: natae05@yandex.ru

The possibility of using HA- and FLAG–tags embedded into CD52 surface protein for magnetic separation of transduced cells *in vitro* was investigated. The efficiency of selection of transfected cell lines, both with single and

binary tags, was shown to exceed 85%. Thus, surface markers on the basis of CD52 protein with integrated HA- and FLAG-tags are applicable for cell selection by the MACS method.

Key words: HA tag, FLAG tag, EGFP, DsRed-Express2, MACS

The progress in experimental cell biology today requires new approaches for studies of biological objects. Methods of cell selection in vitro, as well as the criteria for their selection, attract special attention [1-3]. The main conditions for choosing cell selection methods are sensitivity, purity of selection and preservation of viability of the selected cells.

The aim of this work was to study the applicability of previously developed markers, containing HA- and FLAG-tags integrated into the CD52 surface protein [4], for magnetic selection of transduced cells.

The objects of study were transduced NIH 3T3 cells, constitutively co-expressing HA and FLAG tags with reporter proteins EGFP and DsRedEx2.

The cells were cultured in DMEM medium with 4.5 g/L glucose, with glutamine (PanEko), with addition of 10% fetal bovine serum (HyClone), 100 µg / mL streptomycin and 100 un/mL penicillin at 37°C and 5% CO_2.

Transfection of HEK 293 cells with bicistronic vectors was performed using the calcium phosphate method. At 24 hours after transfection, viral supernatants were collected and used to infect NIH 3T3 cells. To increase the efficiency of transduction, 16 µg / ml of polybrene (Sigma-Aldrich) was added to medium containing the viral supernatant. The control variant NIH 3T3 was transduced with the vector MigR1, which used as a control variant in cytometric measurements.

For separation of transduced cells, LS columns (no. 130-042-401), conjugated supermagnetic beads with monoclonal antibodies µMACS DYKDDDDK isolation kit (no. 130-101-591) and µMACS HA isolation kit (no. 130-091-122) were used from Miltenyi Biotec.

The transduced cells were harvested using TrypLE Express (Gibco) at 37°C for 2-5 min. The harvested cells were centrifuged at 150 × g, the supernatant was removed, and the cells were suspended in 5 mM PBE buffer. The cell suspension was mixed with conjugated supermagnetic beads and incubated at 4°C for 30 min.

Separation of the transduced cells was carried out on LS columns mounted on a MACS magnet (Miltenyi Biotec) after incubating cells with above conjugated magnetic beads, following Miltenyi Biotec manual for the use of corresponding kits and columns.

Cytometric analysis was performed using a BDLSR Fortessa cytometer (BD USA) and Flowing Software.

In the course of this study, transduced cell lines with single (HA-, FLAG-) and binary tags (HA/FLAG) were obtained. The efficiency of cell selection was evaluated according to expression of GFP and DsRed-Express2; in all cases, the selectivity of selection in a mixture of tag-positive and negative cells exceeded 85%. A decrease in the quantity of antibody-conjugated beads during magnetic cell separation increased the purity of the isolated cell population. The possibility of magnetic selection of a double tag-positive cell population was demonstrated. The obtained data can be used to optimize the methods of purification and separation of cell fractions, both in fundamental and applied research.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant № 18-14-00300).

The authors are grateful to D. Mazurov for providing plasmids containing CD52 / HA and CD52 / FLAG coding sequences.

References:

1. *Plouffe BD, Murthy SK, Lewis LH. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review. Rep Prog Phys. 2015 78(1):016601.*
2. *Sutermaster BA , Darling EM. Considerations for high-yield, high-throughput cell enrichment: fluorescence versus magnetic sorting. Sci Rep. 2019 18; 9(1): 227.*
3. *Demin AM, Mekhaev AV, Kandarakov OF, Popenko VI, Leonova OG, Murzakaev AM, Kuznetsov DK, Uimin MA, Minin AS, Shur VY, Belyavsky AV, Krasnov VP. L-Lysine-modified Fe3O4 nanoparticles for magnetic cell labeling. Colloids Surf B Biointerfaces. 2020 190:110879.*
4. *Zotova A, Pichugin A, Atemasova A, Knyazhanskaya E, Lopatukhina E, Mitkin N, Holmuhamedov E, Gottikh M, Kuprash D, Filatov A, Mazurov D. Isolation of gene-edited cells via knock-in of short glycophosphatidylinositol-anchored epitope tags. Sci Rep. 2019 9(1):3132.*

БИОИНФОРМАТИКА И IT

BIOINFORMATICS AND IT

ЗАДАЧИ БИОИНФОРМАТИКИ В ГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ И РАЗРАБОТКЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ, СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И ПРОМЫШЛЕННОСТИ

BIOINFORMATICS TASKS IN GENE RESEARCHING AND DEVELOPMENT OF GENE TECHNOLOGIES FOR HEALTH CARE, AGRICULTURE AND MANUFACTURING INDUSTRY

1. РАЗРАБОТКА НОВОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО СЕНСОРА ФИТОГОРМОНА ЭТИЛЕНА НА ОСНОВАНИИ ПОЛНОГЕНОМНОГО АНАЛИЗА ДАННЫХ ПО СВЯЗЫВАНИЮ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА EIN3
Долгих В. А., Левицкий В. Г., Ощепков Д. Ю., Землянская Е. В. 199

DESIGN OF A NEW ETHYLENE PLANT HORMONE SENSOR BASED ON GENOME-WIDE DATA ANALYSIS OF EIN3 TRANSCRIPTION FACTOR BINDING
Dolgikh V. A., Levitsky V. G., Oshchepkov D. Y., Zemlyanskaya E. V. 200

2. ПРИМЕНЕНИЕ НЕЙРОСЕТЕВОГО КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОГО QSAR-МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРИ ПРОГНОЗЕ АНТИГЛИКИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЙ
Р.А. Литвинов, П.М. Васильев, У.М. Ибрагимова, А.Ш. Рзаева 201

QUANTUM CHEMICAL ARTIFICIAL NEURAL NETWORK QSAR-MODELLING FOR ANTIGLYCATION ACTIVITY PREDICTION
R.A. Litvinov, P.M. Vasilev, U.M. Ibragimova, A.Sh. Rzaeva 202

3. РЕКОНСТРУКЦИЯ ЭВОЛЮЦИИ ГЕНОМНЫХ СТРУКТУР С ПАРАЛОГАМИ
Горбунов К.Ю., Любецкий В.А. 207

RECONSTRUCTION OF EVOLUTION OF GENOME STRUCTURES WITH PARALOGS
Gorbunov K.Yu., Lyubetsky V.A. 208

4. МОДЕЛИРОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИСПОСОБЛЕННОСТИ И ПОДВИЖНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ИЗМЕНЯЮЩИХСЯ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ
Клименко А.И., Лашин С.А., Матушкин Ю.Г. 203

MODELING CHANGES IN THE ADAPTABILITY AND MOTILITY OF MICROORGANISMS IN CHANGING AQUATIC ECOSYSTEMS
A.I. Klimenko, S.A. Lashin, Yu.G. Matushkin 204

5. ХАРАКТЕРИСТИКИ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ MIRNA В MRNA ГЕНОВ MYB АРАБИДОПСИСА, СОИ И ВИНОГРАДА
Пинский И. В. 205

CHARACTERISTICS OF MIRNA BINDING SITES IN MRNAS OF MYB GENES OF ARABIDOPSIS, SOYA AND GRAPE
Pinskiy I.V. 206

6. РЕПОЗИЦИОНИРОВАНИЕ ЛЕКАРСТВ ДЛЯ ТЕРАПИИ COVID-19
Поройков В.В., Дружиловский Д.С., Савосина П.И., Гомазков О.А., Соболев Б.Н., Веселовский А.В., Тарасова О.А., Бизюкова Н. Ю., Ионов Н.С., Иванов С.М., Рудик А.В., Столбов Л.А., Погодин П.В., Карасев Д. А., Дмитриев Д.А., Лагунин А.А., Филимонов Д.А. 209

DRUG REPOSITIONING FOR THERAPY OF COVID-19
Poroikov V.V., Druzhilovskiy D.S., Savosina P.I., Gomazkov O.A., Sobolev B.N., Veselovsky A.V., Tarasova O.A., Biziukova N. Yu., Ionov N.S., Ivanov S. M., Rudik A.V., Stolbov L.A., Pogodin P.V., Karasev D.A., Dmitriev D.A., Lagunin A.A., Filimonov D.A. 210

7. TCR-PRED – ВЕБ-СЕРВИС ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЭПИТОПОВ ДЛЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ CDR3 Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ В ВИДЕ СТРУКТУРНЫХ ФОРМУЛ
Смирнов А.С., Рудик А.В., Филимонов Д.А., Лагунин А.А. 212

TCR-PRED – WEB SERVICE FOR PREDICTING THE SPECIFICITY OF EPITOPES FOR TCR CDR3 SEQUENCES BASED ON THEIR STRUCTURAL FORMULAS
Smirnov A.S., Rudik A.V., Filimonov D.A., Lagunin A.A. 213

УДК 575.112 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-199-200

РАЗРАБОТКА НОВОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО СЕНСОРА ФИТОГОРМОНА ЭТИЛЕНА НА ОСНОВАНИИ ПОЛНОГЕНОМНОГО АНАЛИЗА ДАННЫХ ПО СВЯЗЫВАНИЮ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА EIN3

Долгих В.А., Левицкий В.Г., Ощепков Д.Ю., Землянская Е.В.

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН)
630090, Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, д. 10, e-mail: dolgikh@bionet.nsc.ru

Впервые охарактеризован новый структурный вариант сайта связывания транскрипционного фактора EIN3, ключевого компонента сигнального пути фитогормона этилена. Было установлено, что данный структурный вариант наиболее значимо ассоциирован с транскрипционным ответом на этилен и является предпочтительным для связывания EIN3 в геноме модельного растения *Arabidopsis thaliana*. На основе данного структурного варианта был разработан новый генетический сенсор этилена.

Ключевые слова: этилен; транскрипционные факторы; EIN3; транскрипционный ответ; генетический сенсор; ChIP-seq; RNA-seq; *Arabidopsis thaliana*

Гормон растений этилен является ключевым регулятором широкого спектра физиологических процессов: созревания плодов, роста и развития растений, их старения, а также реакций на стресс. Для изучения особенностей действия этилена в разных органах и тканях необходимо решить задачу детекции паттернов его распределения в растении. Она решается путем создания генетических сенсоров этилена. В основе существующего сенсора EBS::GUS лежит сайт связывания транскрипционного фактора EIN3 (EIN3 binding site, EBS), ключевого элемента сигнального пути этилена, регулирующего экспрессию репортерного гена GUS. Однако, транскрипционные репортеры воспринимают сигналы гормонов косвенно, и результат может зависеть от свойств конкретного транскрипционного фактора и цис-элементов, используемых для создания синтетического промотора. Создание геносенсоров, основанных на альтернативных вариантах EBS помогло бы преодолеть это ограничение. В данном исследовании мы провели системный биоинформатический анализ регионов связывания EIN3 в геноме Arabidopsis thaliana с целью выявить альтернативные структурные варианты EBS.

Мы проанализировали данные ChIP-seq по связыванию EIN3 в геноме *A. thaliana*, а также данные RNA-seq по этилен-индуцированным транскриптомам [1]. Поиск обогащенных мотивов *de novo* в пиках ChIP-seq проводили при помощи инструмента Homer [2], а анализ обогащения структурных вариантов найденных мотивов анализировали при помощи инструмента MCOT [3]. Ассоциацию наличия мотива в промоторах генов с ответом на этилен (по данным RNA-seq) вычисляли при помощи точного теста Фишера. В результате анализа мы обнаружили ранее неизвестный структурный вариант EBS, представляющий собой инвертированный повтор двух EBS с перекрыванием копий в 1 нуклеотид, обогащенный в пиках более значимо, чем одиночный EBS. Мы назвали его 2EBS(-1). 2EBS(-1), но не повторы EBS, разделенных спейсером, обогащен в пиках ChIP-seq EIN3. На основании данных результатов мы сделали вывод, что именно 2EBS(-1) является предпочтительным структурным вариантом для связывания EIN3. Также, 2EBS(-1) более значимо, чем другие структурные варианты EBS, исследованные в работе, ассоциирован с транскрипционным ответом на этилен. Поэтому мы использовали структурный вариант 2EBS(-1) для разработки нового генетического сенсора этилена. Его использование наряду с существующим поможет исследователям более глубоко понять молекулярные механизмы, лежащие в основе этилен-регулируемого транскрипционного и физиологического ответа у растений.

Литература

1. *Chang K. N. et al. Temporal transcriptional response to ethylene gas drives growth hormone cross-regulation in Arabidopsis // Elife. 2013. V. 2, P. e00675.*
2. *Heinz S. et al. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and b cell identities // Mol. Cell. 2010. V. 38, N. 4, P. 576-589.*
3. *Levitsky V. et al. A single ChIP-seq dataset is sufficient for comprehensive analysis of motifs co-occurrence with MCOT package // Nucleic Acids Res. 2019. V. 47, N. 21, P. e139.*

UDC 575.112 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-199-200

DESIGN OF A NEW ETHYLENE PLANT HORMONE SENSOR BASED ON GENOME-WIDE DATA ANALYSIS OF EIN3 TRANSCRIPTION FACTOR BINDING

Dolgikh V.A., Levitsky V.G., Oshchepkov D.Y., Zemlyanskaya E. .

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (ICG SB RAS)
630090, Novosibirsk, Prospekt Akademika Lavrentyeva, 10
email: dolgikh@bionet.nsc.ru

A new structural variant of the transcription factor EIN3 binding site has been obtained. This structural variant is strongly associated with the transcriptional response to ethylene and is preferred for EIN3 binding. Based on this structural variant, a new genetic ethylene sensor was developed.

Keywords: ethylene; transcription factors; EIN3; transcriptional response; genetic sensor; ChIP-seq; RNA-seq; *Arabidopsis thaliana*

The plant hormone ethylene is a key regulator of a wide range of physiological processes: ripening of fruits, growth and development of plants, their aging, as well as reactions to stress. To study the features of the action of ethylene in various organs and tissues, it is necessary to solve the problem of detecting patterns of its distribution in a plant. This task is solved by creating genetic sensors for ethylene. The existing sensor called EBS::GUS based on the EIN3 transcription factor binding site (EBS), which is a key element of the ethylene signaling pathway, which regulates the expression of the GUS reporter gene. However, transcriptional reporters perceive hormone signals indirectly, and the result may depend on the properties of the particular transcription factor and cis-elements used to create the synthetic promoter. The creation of genetic sensors based on alternative EBS variants would help overcome this limitation at least in this case. In this study we performed a systemic bioinformatic analysis of the EIN3 binding regions in the *A. thaliana* genome to identify alternative structural variants of EBS.

We analyzed ChIP-seq data on EIN3 binding in the A. thaliana genome and RNA-seq data on ethylene-induced transcriptomes [1]. De novo search of enriched motifs in the ChIP-seq peaks was performed using the Homer tool [2], and the enrichment analysis of found motifs structural variants was analyzed using the MCOT tool [3]. The association of the motif presence in gene promoters with the ethylene response (according to RNA-seq data) was calculated using Fisher's exact test. As a result of the analysis, we found a previously unknown structural variant of EBS, which is an inverted repeat of two EBS with overlapping copies of 1 nucleotide, enriched in peaks more significantly than a single EBS. We named it 2EBS(-1). 2EBS(-1), but not EBS repeats separated by spacer, enriched in the EIN3 ChIP-seq peaks. Based on these results, we concluded that 2EBS(-1) is the preferred structural variant for EIN3 binding. Also, 2EBS(-1) is more significant than other structural variants of EBS studied in the work, associated with the transcriptional response to ethylene. Therefore, we used the structural variant 2EBS(-1) to develop a new genetic sensor for ethylene. Its use along with the existing one will help researchers to better understanding the molecular mechanisms underlying ethylene-regulated transcriptional and physiological responses in plants.

References

1. *Chang K. N. et al. Temporal transcriptional response to ethylene gas drives growth hormone cross-regulation in Arabidopsis // Elife. 2013. V. 2, P. e00675.*
2. *Heinz S. et al. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and b cell identities // Mol. Cell. 2010. V. 38, N. 4, P. 576-589.*
3. *Levitsky V. et al. A single ChIP-seq dataset is sufficient for comprehensive analysis of motifs co-occurrence with MCOT package // Nucleic Acids Res. 2019. V. 47, N. 21, P. e139.*

УДК 615.015.11: 004.852 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-201-201

ПРИМЕНЕНИЕ НЕЙРОСЕТЕВОГО КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОГО QSAR-МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРИ ПРОГНОЗЕ АНТИГЛИКИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЙ

Р.А. Литвинов[1,2], **П.М. Васильев**[1], **У.М. Ибрагимова**[1], **А.Ш. Рзаева**[1]

1 – ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, Волгоград, Россия
400131, Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1
2 – ГБУ ВМНЦ, Волгоград, Россия
400131, Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1
e-mail: litvinov.volggmu@mail.ru

В результате работ по построению оптимальной квантово-химической нейросетевой модели прогноза антигликирующей активности получен ряд нейросетей с различными характеристиками.

Ключевые слова: антигликирующая активность; энергии молекулярных орбиталей, искусственные нейронные сети.

Энергии молекулярных орбиталей (МО) химических соединений могут быть использованы как дескрипторы при прогнозировании фармакологических свойств, в том числе антигликирующей активности [1]. Реакция гликирования ведет к образованию токсичных конечных продуктов (КПГ). КПГ принимают участие в патогенезе поздних осложнений сахарного диабета, болезнях, ассоциированных с пожилым возрастом и др.

Показано, что искусственные нейронные сети позволяют выявить зависимость величины антигликирующей активности соединений от энергий МО [2, 3, 4, 5]. В ходе работы были обучены классификационные и корреляционные нейросетевые модели различной точности, способные прогнозировать активность на основе: 1) энергий граничных МО [2, 3]; 2) сочетания энергий граничных МО и дескрипторов структурной формулы [4]; 3) набора из нескольких МО [5].

Таким образом доказано, что метод искусственных нейросетей предоставляет возможность для прогнозирования антигликирующей активности соединений на основе данных об энергиях их МО.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых ученых - кандидатов наук, МК-1887.2020.7.

Литература

1. *Frau J., Glossman-Mitnik D. Chemical Reactivity Theory Study of Advanced Glycation Endproduct Inhibitors // Molecules. 2017. Vol. 22(2). 226.*
2. *Litvinov R. A., Drokin R. A., Shamshina D. D. et al. Prediction of Antiglycation Activity by Calculating the Energies of Frontier Molecular Orbitals for New 4-Hydroxy-1,4-Dihydroazolo[5,1-c]-1,2,4-Triazines Used as an Example // Russ J Bioorg Chem. 2020. Vol. 46, P. 1278–1284.*
3. *Литвинов Р. А., Васильев П. М., Брель А. К., Лисина С. В Энергии граничных молекулярных орбиталей как фактор прогноза антигликирующей активности N-гидроксибензоил-производных тимина и урацила // Химико-фармацевтический журнал. – 2021. – Т. 55. – № 7. – С. 18-24.*
4. *Литвинов Р.А., Лисина С.В., Брель А.К. и др. Нейросетевая модель антигликирующей активности N-гидроксибензоил производных тимина и урацила // VI Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии»: тезисы докл. (Нижний Новгород, 27-30 сент. 2020 г.). – Нижний Новгород, 2020. – С. 62.*
5. *Литвинов Р.А., Васильев П.М., Дрокин Р.А. и др. Квантово-химическая нейросетевая QSAR-модель прогноза антигликирующей активности производных азолотриазина // XXVII Международный симпозиум «Биоинформатика и компьютерное конструирование лекарств»: тезисы докл. (Москва, 5-7 апр. 2021 г.). – Москва, 2021. – С. 31.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-201-202

QUANTUM CHEMICAL ARTIFICIAL NEURAL NETWORK QSAR-MODELLING FOR ANTIGLYCATION ACTIVITY PREDICTION

R.A. Litvinov[1,2], **P.M. Vasilev**[1], **U.M. Ibragimova**[1], **A.Sh. Rzaeva**[1]

1 – FSBEI HE VolSMU of the Ministry of Health of Russia, Volgograd, Russia
1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russian Federation, 400131
2 – VMRC, Volgograd, Russian Federation
1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russian Federation, 400131
e-mail: litvinov.volggmu@mail.ru

As a result of work to create the optimal quantum-chemical neural network model for antiglycation activity prediction, a set of different neural network models was received.

Keywords: antiglycation activity; energies of molecular orbitals, artificial neural networks.

Molecular orbital (MO) energies can be used as descriptors in prediction of pharmacological properties of novel compounds including antiglycation activity [1]. The glycation reaction leads to the formation of toxic advanced glycation end-products (AGEs). AGEs are involved in the pathogenesis of long-term diabetes mellitus complications, diseases associated with old age etc.

It has been shown that artificial neural networks make it possible to reveal the dependence of antiglycation activity of compounds on the energies of MO [2, 3, 4, 5]. Classification and correlation neural networks of various accuracy were trained based on: 1) energies of frontier MOs [2, 3]; 2) the combination of frontier MO energies and descriptors of the structural formula [4]; 3) a set of several MO energies [5].

Thus, it has been proved that the method of artificial neural networks provides an opportunity for antiglycation activity prediction using MO energies.

This work was supported by a grant from the President of the Russian Federation for young scientists – candidates of sciences, MK-1887.2020.7.

References

1. *Frau J., Glossman-Mitnik D. Chemical Reactivity Theory Study of Advanced Glycation Endproduct Inhibitors // Molecules. 2017. Vol. 22(2). 226.*
2. *Litvinov, R. A., Drokin, R. A., Shamshina, D. D. et al. Prediction of Antiglycation Activity by Calculating the Energies of Frontier Molecular Orbitals for New 4-Hydroxy-1,4-Dihydroazolo[5,1-c]-1,2,4-Triazines Used as an Example // Russ J Bioorg Chem. 2020. Vol. 46, P. 1278–1284.*
3. *Litvinov R. A., Vasil'ev P. M., Brel' A. K., Lisina S. V. Boundary molecular orbital energies as descriptors for prediction of antiglycating activity of N-hydroxybenzoyl-substituted thymine and uracil // Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal. 2021. Vol. 55. № 7. P. 18-24. [Article in Russian, Abstract in English].*
4. *Litvinov R. A., Lisina S. V., Brel A. K. et al. Nejrosetevaya model' antiglikiruyushchej aktivnosti N-gidroksibenzoil proizvodnyh timina i uracila [Neural network model of antiglycation activity prediction of N-hydroxybenzoyl derivatives of thymine and uracil] // VI Interdisciplinary Conference «Molecular and Biological Aspects of Chemistry, Pharmaceuticals and Pharmacology»: abstr. (Nizhny Novgorod, Sept. 27-30 2020). – Nizhny Novgorod, 2020. – P. 62. [Abstract in Russian].*
5. *Litvinov R. A., Vasilev P. M., Drokin R. A. et al. Kvantovo-himicheskaya nejrosetevaya QSAR-model' prognoza antiglikiruyushchej aktivnosti proizvodnyh azolotriazina [Quantum-chemical neural network QSAR-model for prediction the antiglycation activity of azolotriazine derivatives] // XXVII Symposium on bioinformatics and computer-aided drug discovery: abstr. (Moscow, Apr. 5-7 2021). – Moscow, 2021.*

УДК 573.22 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-203-204

МОДЕЛИРОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИСПОСОБЛЕННОСТИ И ПОДВИЖНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ИЗМЕНЯЮЩИХСЯ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

Клименко А.И.[1,2]**, Лашин С.А.**[1,2]**, Матушкин Ю.Г.**[1]

[1] *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*
[2] *Курчатовский геномный центр, Институт цитологии и генетики СО РАН*
Россия, 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева 10, e-mail: mat@bionet.nsc.ru

Результаты нашего имитационного моделирования показывают, что подвижные формы (в отличие от оседлых) имеют преимущество в условиях недостатка питательных веществ, соответствующих среде, в которой обитают морские бактерии. Существует порог величины штрафа за миграцию, определяющий, будет ли стратегия Кочевника успешной или нет.

Ключевые слова: подвижность, миграционные издержки, морские бактерии, агент-ориентированное моделирование, экологическое моделирование

Подвижность является одним из ключевых факторов адаптации бактерий, живущих в скудных морских средах. Данное имитационное исследование посвящено вопросу о том, как способность к адаптивным миграциям влияет на успешность микробной популяции в различных условиях. Рассмотрена модель конкуренции подвижных и малоподвижных популяций микроорганизмов в замкнутой водной среде, снабжаемой периодическим порционным источником питательных веществ, и оценили приспособленность тех и других. Изучено влияние таких факторов, как концентрация питательных веществ, период подачи порции, тип смертности и энергетические затраты на миграцию. Определены условия, благоприятствующие различным стратегиям - кочевой, характерной для подвижной популяции, и оседлой. Показано, что существует порог энергетических затрат на миграцию, определяющий, успешна ли стратегия кочевника или нет. Однако эта величина сильно зависит от таких условий, как доступность питательных веществ. Даже без штрафов за миграцию при определенных условиях оседлая популяция способна достичь доминирующего положения в экосистеме. Это достигается за счет снижения локальной доступности питательных веществ вблизи источника питательных веществ, в то время как подвижные популяции, полагающиеся на стратегию локальной оптимизации, как правило, следуют за благоприятными условиями и не выдерживают стресса, связанного с пересечением областей субоптимальной доступности питательных веществ.

Следует отметить, что два вида сценариев моделирования, описывающих смертность либо квадратичным, либо линейным членом, соответствуют классической плотностно-зависимой смертности Ферхюльста и линейно-пропорциональной смертности, обусловленной постоянными неблагоприятными факторами.

Оказалось, что более динамичные и дефицитные среды благоприятствуют доминированию подвижных популяций, в то время как затраты на подвижность превышают выгоду в богатых питательными веществами и застойных средах, которые, как правило, способствуют доминированию малоподвижных микроорганизмов. Квадратичная смертность, зависящая от плотности, более губительна для подвижной популяции, чем линейная, поскольку хемотаксис заставляет ее клетки организовываться в плотно заселенные области.

Подвижные формы имеют преимущество в условиях недостатка питательных веществ, что характерно для сред, в которых обитают морские бактерии. Однако, поскольку в природе мы наблюдаем сосуществование обеих стратегий, и ни одна из них полностью не вытесняет другую, вопрос о механизмах поддержания такого разнообразия приобретает особую актуальность для дальнейших исследований. Как показывают некоторые исследования [1, 2], динамичная и микрогетерогенная природа водной среды может быть одним из возможных факторов, который приводит к постоянному изменению направления отбора, препятствуя закреплению одной определённой стратегии.

Исследование поддержано Курчатовским геномным центром Института цитологии и генетики СО РАН (075-15-2019-1662).

Литература

1. *Yawata, Y., Cordero, O. X., Menolascina, F., Hehemann, J. H., Polz, M. F., and Stocker, R. (2014). Competition-dispersal tradeoff ecologically differentiates recently speciated marine bacterioplankton populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 5622–5627. doi:10.1073/pnas.1318943111.*

2. Yawata, Y., Carrara, F., Menolascina, F., and Stocker, R. (2020). Constrained optimal foraging by marine bacterioplankton on particulate organic matter. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 117, 25571–25579. doi:10.1073/pnas.2012443117.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-203-204

MODELING CHANGES IN THE ADAPTABILITY AND MOTILITY OF MICROORGANISMS IN CHANGING AQUATIC ECOSYSTEMS

A.I. Klimenko[1,2], **S.A. Lashin**[1,2], **Yu.G. Matushkin**[1]

[1] *Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Lavrentiev avenue 10, Novosibirsk, Russian Federation, 630090*
[2] *Kurchatov Genomics Center, Institute of Cytology and Genetics, SB RAS*
e-mail: mat@bionet.nsc.ru

The results of our simulations show that motile forms (as opposed to sedentary forms) have an advantage under nutrient-poor conditions corresponding to the environment in which marine bacteria live. There is a turning point in the magnitude of the migration penalty that determines whether the Nomadic strategy will be successful or not.

Keywords: motility, migration costs, marine bacteria, agent-based modeling, ecological modeling.

Motility is one of the key factors of adaptation in sparse marine environments populated by bacteria. This simulation study focuses on how the ability to adaptively migrate affects the success of microbial populations under different conditions. A model of competition between motile and sedentary microbial populations in a confined aquatic environment supplied by a periodic batch source of nutrients is considered and the adaptability of both is evaluated. The influence of such factors as nutrient concentration, batch period o, type of mortality and energy expenditure on migration was studied. Conditions favoring different strategies, the nomad of a motile population and the settler of a sedentary population, were determined. It is shown that there is a turning point in the energy costs of migration, which determines whether the strategy of the nomad of a motile population is successful or not. However, this value is highly dependent on conditions such as nutrient availability. Even without migration penalties, under certain conditions, a sedentary population is able to achieve a dominant position in the ecosystem. This is achieved by reducing the local availability of nutrients near the nutrient source, while motile populations relying on a local optimization strategy tend to follow favorable conditions and cannot withstand the stress associated with crossing areas of suboptimal nutrient availability.

It should be noted that two types of modeling scenarios describing mortality with either a quadratic or linear term correspond to the classical density-dependent Verhulst mortality and the linear-proportional mortality due to constant adverse factors.

More dynamic and deficient environments were found to favor the dominance of motile populations, while the costs of motility exceeded the benefits in nutrient-rich and stagnant environments, which tended to favor the dominance of sedentary microorganisms. Density-dependent quadratic mortality is more detrimental to a motile population than linear mortality because chemotaxis forces its cells to organize themselves into densely populated areas.

The motile forms have an advantage in nutrient-poor conditions, corresponding to the environment in which the marine bacteria live. However, since we observe that both strategies thrive in nature, and neither strategy completely supersedes the other, the question of how this diversity is maintained becomes one of the intriguing problems for further research. As some studies [1, 2] show, the dynamic and microheterogeneous nature of the aquatic environment may be one possible factor that leads to a constant change in the direction of selection, preventing the emergence of selective sweeps.

The study is supported by the Kurchatov Genomic Centre of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS (075-15-2019-1662).

References

1. Yawata, Y., Cordero, O. X., Menolascina, F., Hehemann, J. H., Polz, M. F., and Stocker, R. (2014). Competition-dispersal tradeoff ecologically differentiates recently speciated marine bacterioplankton populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 5622–5627. doi:10.1073/pnas.1318943111.
2. Yawata, Y., Carrara, F., Menolascina, F., and Stocker, R. (2020). Constrained optimal foraging by marine bacterioplankton on particulate organic matter. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 117, 25571–25579. doi:10.1073/pnas.2012443117.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-205-206

ХАРАКТЕРИСТИКИ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ MIRNA В MRNA ГЕНОВ MYB АРАБИДОПСИСА, СОИ И ВИНОГРАДА

Пинский И.В.

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Республика Казахстан
050040, Алматы, проспект аль-Фараби, 71
e-mail: ilya.pinskyi@mail.ru

Установлены характеристики сайтов связывания различных miRNA с mRNA генов семейства транскрипционных факторов *MYB Arabidopsis thaliana, Glycine max* и *Vítis vinifera*. Наиболее консервативными среди них оказались сайты связывания miRNA семейства miR828.

Ключевые слова: miRNA; mRNA; гены; транскрипционные факторы.

Самое большое семейство транскрипционных факторов MYB оказывает влияние на развитие, метаболизм и ответ на биотический и абиотический стресс растений. В настоящее время имеется мало сведений о связи miRNA с экспрессией этих генов. Поэтому представлялось важным изучить характеристики связывания miRNA с mRNA генов *MYB*, участвующих во всех ключевых процессах, протекающих в клетках растений. Объектами исследований являлись полностью секвенированные геномы трёх видов двудольных покрытосеменных растений: *Arabidopsis thaliana, Glycine max* и *Vítis vinifera* (так как арабидопсис – модельный объект генетических исследований, а соя и виноград являются распространёнными сельскохозяйственными растениями)[1-3]. Нуклеотидные последовательности mRNA генов транскрипционных факторов были получены из базы данных по транскрипционным факторам растений Plant TFDB (Plant Transcription Factor Database, *planttfdb.cbi.pku.edu.cn/*). Нуклеотидные последовательности miRNA были заимствованы из miRBase (*http://www.mirbase.org*). Сайты связывания miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA генов были предсказаны с помощью программы miRDB (*http://mirdb.org/*). Был проведен поиск сайтов связывания 337 miRNA в mRNA 144 генов *MYB* у *A. thaliana* с уровнем комплементарности не менее 90%. В результате поиска было выявлено, что ath-miR5658 имела сайты связывания в mRNA девяти генов (*AT1G26780, AT1G49010, AT2G36890, AT4G05100, AT4G18770, AT4G25560, AT5G15310, AT5G54230, AT5G62470*). ath-miR159 связывалась с mRNA шести генов (*AT2G26950, AT2G32460, AT3G11440, AT3G60460, AT5G06100* и *AT5G55020*). У ath-miR828 имеется три гена-мишени (*AT1G56650, AT1G66370 и AT5G52600*). Геном сои кодирует 639 gma-miRNA и 369 белков семейства *MYB*. Из всех gma-miRNA только 25 miRNA имеют сайты связывания в mRNA 128 генов семейства *MYB* с уровнем комплементарности не менее 90 % и общее число таких сайтов равно 97. Наибольшее число генов-мишеней (одиннадцать) имели gma-miR159a-3p, gma-miR159e-3p и gma-miR319. Семейство gma-miR828a,b имело восемь генов-мишеней (*Glyma09g37340, Glyma10g35050, Glyma10g35061, Glyma18g49360, Glyma19g40250, Glyma19g44660, Glyma20g32500, Glyma20g32510*). gma-miR156aa имела полностью комплементарные сайты связывания в mRNA шести генов (*Glyma04g15150, Glyma06g47000, Glyma13g04031, Glyma13g25716, Glyma15g35860, Glyma20g11040*). У винограда семейство *MYB* состоит из 138 белков. Из 186 vvi-miRNA только пять miRNA связывались с mRNA двадцати генов семейства *MYB* со степенью комплементарности не менее 90% (vvi-miR159c, vvi-miR167a, vvi-miR394b, vvi-miR828a и miR828b). vvi-miR828a и vvi-miR828b имели наибольшее число мишеней – 11 и 13 генов, соответственно. Полученные результаты биоинформационного анализа являются важной теоретической основой для будущих экспериментальных исследований.

Литература

1. Черных О.А., Левицкий В.Г., Омельянчук Н.А., Миронова В.В. Компьютерный анализ и функциональная аннотация сайтов связывания транскрипционных факторов AP2/ERF в геноме ARABIDOPSIS THALIANA L. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т. 18, № 4/2. С. 887-897.

2. Sunkar R., Zhu J.K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis // Plant Cell. 2004. V. 16. P. 2001-2019.

3. Axtell, M.J. Classification and Comparison of Small RNAs from Plants // Ann. Rev. of Plant Biol. 2013. V. 64, № 1. P. 137–159.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-205-206

CHARACTERISTICS OF MIRNA BINDING SITES IN MRNAS OF MYB GENES OF ARABIDOPSIS, SOYA AND GRAPE

Pinskiy I.V.

Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Republic of Kazakhstan
050040, Almaty city, al-Farabi avenue, 71
e-mail: ilya.pinskyi@mail.ru

The characteristics of various miRNA binding sites in the mRNAs of the *MYB* transcription factor genes of *Arabidopsis thaliana, Glycine max* and *Vitis vinifera* have been established. The most conserved miRNA binding sites were the binding sites of the miR828 family.

Key words: miRNAs; mRNAs; genes; transcription factors.

The largest family of transcription factors, *MYB*, influences the development, metabolism and response to biotic and abiotic stress in plants. Currently, there is little information about the relationship of miRNA with the expression of these genes. Therefore, it seemed important to study the characteristics of miRNA binding to mRNA of MYB genes involved in all key processes in plant cells. The objects of research were fully sequenced genomes of three species of dicotyledonous angiosperms: *Arabidopsis thaliana, Glycine max* and *Vitis vinifera* (since Arabidopsis is a model object of genetic research, and soybeans and grapes are common agricultural plants) [1-3]. The mRNA nucleotide sequences of the transcription factor genes were obtained from the Plant Transcription Factor Database (*planttfdb.cbi.pku.edu.cn/*). The miRNA nucleotide sequences were borrowed from miRBase (*http://www.mirbase.org*). The miRNA binding sites in the 5'UTR, CDS and 3'UTR of mRNA genes were predicted using the miRDB program (*http://mirdb.org/*). We searched for binding sites of 337 miRNAs in the mRNA of 144 MYB genes in *A. thaliana* with a complementarity level of at least 90%. The search revealed that ath-miR5658 had mRNA binding sites for nine genes (*AT1G26780, AT1G49010, AT2G36890, AT4G05100, AT4G18770, AT4G25560, AT5G15310, AT5G54230, AT5G62470*). ath-miR159 bound to the mRNA of six genes (*AT2G26950, AT2G32460, AT3G11440, AT3G60460, AT5G06100,* and *AT5G55020*). Ath-miR828 has three target genes (*AT1G56650, AT1G66370*, and *AT5G52600*). The soybean genome encodes 639 gma-miRNAs and 369 proteins of the MYB family. Of all gma-miRNAs, only 25 miRNAs have binding sites in the mRNA of 128 genes of the MYB family with a complementarity level of at least 90%, and the total number of such sites is 97. gma-miR159a-3p, gma-miR159e -3p and gma-miR319 had the largest number of target genes (eleven). The gma-miR828a,b family had eight target genes (*Glyma09g37340, Glyma10g35050, Glyma10g35061, Glyma18g49360, Glyma19g40250, Glyma19g44660, Glyma20g32500, Glyma20g32510*). gma-miR156aa had completely complementary mRNA binding sites for six genes (*Glyma04g15150, Glyma06g47000, Glyma13g04031, Glyma13g25716, Glyma15g35860, Glyma20g11040*). In grape, the MYB family consists of 138 proteins. Of 186 vvi-miRNAs, only five miRNAs bind to mRNAs of twenty genes of the MYB family with a degree of complementarity of at least 90% (*vvi-miR159c, vvi-miR167a, vvi-miR394b, vvi-miR828a, and miR828b*). vvi-miR828a and miR828b had the largest number of targets – 11 and 13 genes, respectively. The obtained results of the bioinformatical analysis are the important theoretical basis for future experimental studies.

References

1. *Chernyh O.A., Levickij V.G., Omel'janchuk N.A., Mironova V.V. Komp'juternyj analiz i funkcional'naja annotacija sajtov svjazyvanija transkripcionnyh faktorov AP2/ERF v genome ARABIDOPSIS THALIANA L. // Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii. 2014. T. 18, № 4/2. S. 887-897.*
2. *Sunkar R., Zhu J.K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis // Plant Cell. 2004. V. 16. P. 2001-2019.*
3. *Axtell, M.J. Classification and Comparison of Small RNAs from Plants // Ann. Rev. of Plant Biol. 2013. V. 64, № 1. P. 137–159.*

УДК 575.83 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-207-209

РЕКОНСТРУКЦИЯ ЭВОЛЮЦИИ ГЕНОМНЫХ СТРУКТУР С ПАРАЛОГАМИ

Горбунов К.Ю., Любецкий В.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук, 127051, г. Москва, Большой Каретный переулок, д.19 стр. 1. e-mail: lyubetsk@iitp.ru

Для любых нагруженных ориентированных chain-cycle graphs a и b (называемых *структурами*) и любых равных цен операций (переклеек и дупликации), получен алгоритм, который, последовательно применяя эти операции к a, выдаёт b, если первая структура не содержит паралогов (рёбер с повторяющимся именем), а во второй не более двух паралогов для каждого ребра. Алгоритм имеет мультипликативную ошибку не более 13/9 + ε, где ε – любое строго положительное число, и время его работы порядка $n^{O(\varepsilon^{-2.6})}$, где n – размер исходной пары графов. Также получены алгоритмы реконструкции эволюции геномных структур с условием на предковые структуры и вдоль филогенетического дерева.

Ключевые слова: геномная структура; геномные перестройки; преобразование генома; DCJ-операции; дупликация гена; мультипликативно точный алгоритм.

Структурой называется любой ориентированный граф, компоненты которого – цепи и циклы, а рёбрам приписаны имена (в этом состоит нагруженность графа). Ребро всегда рассматривается в паре с его именем (но не с ориентацией). Структура описывает геном, где каждая компонента играет роль хромосомы, а ребро графа – роль гена. Повторение ребра состоит в присутствии в структуре второго ребра с тем же именем; число разрешённых повторений существенно влияет на сложность задачи. Рассматриваются задачи преобразования и реконструкции структур, которые состоят в поиске: (1) *кратчайшего преобразования* одной структуры *a* в другую *b* посредством заданных операций над структурами; и (2) *кратчайшей реконструкции* структур, заданных в листьях дерева, на его внутренние вершины. Задачу (2) иногда описывают как поиск *кратчайшей расстановки* структур, заданных в листьях дерева, по его внутренним вершинам. В этих задачах «кратчайшее» означает минимум соответствующего функционала. В первом случае функционал это – суммарная цена преобразования *a* в *b*, а во втором случае – *суммарная цена расстановки* структур по внутренним вершинам дерева. В точке минимума говорят, соответственно, о «кратчайшей цене» преобразования/расстановки и «кратчайшем преобразовании»/«кратчайшей расстановке». Таким образом, обе задачи описывают эволюцию геномных структур a в b, и реконструкцию эволюции вдоль филогенетического дерева видов. В структуре ребро с повторяющимся именем называется *паралогичным*, а каждое его повторение – *паралогом* (соответствующего ребра). Звездой называется дерево, состоящее из корня и рёбер, которые ведут из корня в листья. *Локально* кратчайшая реконструкция (расстановка) – такая, что в любой одной вершине дерева замена структуры в ней на любую другую не уменьшает значение функционала. Если две или более структур не имеют паралогов и в них множества имён рёбер равны, то говорят, что это – структуры с *равным составом*; если не имеют паралогов и множества имён рёбер не обязательно равны – с *неравным составом*. Структуры, в которых паралоги могут присутствовать, но множества имён равны, назовём с *квазиравным составом*. DCJ-Операции, которыми разрешено преобразовывать структуру *a* в *b*, в последовательности промежуточных структур от *a* до *b* могут повторяться неограниченное число раз. Каждая операция имеет свою цену – строго положительное рациональное число. Здесь снова различают два случая: цены всех операций *равны* (тогда их можно считать равными 1) или это не так (*разные* цены). Различают два случая задачи преобразования: все структуры без *паралогов* или *паралоги* разрешаются; соответственно говорят о задаче преобразования без *паралогов* и с *паралогами*. Задача с *паралогами* алгоритмом линейной сложности сводится к задаче целочисленного линейного программирования. В присутствии *паралогов* эта задача NP-трудная. Для NP-трудных задач важна разработка эффективных приближённых, но с хорошей точностью алгоритмов. Эффективность предполагает, что время работы алгоритма описывается полиномом низкой степени; обычно 1-ой или 2-ой степени от размера исходных данных. Кроме алгоритма, указанного в абстракте, получены, в частности, следующие результаты. При равном множестве имён в структурах и равных ценах операций рассмотрены следующие условия на них: все структуры из одного цикла, все из одной цепи, все из цепей. Для каждого условия получен точный (т.е. с нулевой ошибкой) алгоритм преобразования данных *a* в *b*, квадратичный по времени работы. Для другого списка операций (склейка и расклейка вершины, удаление и добавление ребра) над структурами и

уже произвольных цен операций получен алгоритм продолжения структур, заданных в листьях дерева, на его внутренние вершины. Алгоритм точен, если дерево – звезда; при этом в листьях структуры могут быть даже с неравным множеством имён или с паралогами. Время работы алгоритма порядка $nX + n^2 log(n)$, где n – число имён в листьях и X – легко вычислимая характеристика структур в листьях. В общем случае алгоритм находит локально минимальное решение и время его работы кубическое.

Благодарность. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18–29–13037.

UDC 575.83 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-207-209

RECONSTRUCTION OF EVOLUTION OF GENOME STRUCTURES WITH PARALOGS

Gorbunov K.Yu., Lyubetsky V.A.

Institute for Information Transmission Problems of the Russian Academy of Sciences (Kharkevich Institute), Moscow, Russia,
Bolshoy Karetny per. 19, build.1, Moscow 127051 Russia. e-mail: lyubetsk@iitp.ru

For any weighted directed chain-cycle graphs a and b (referred to as *structures*) and any equal costs of operations (intermergings and duplication), we obtain an algorithm which, by successively applying these operations to a, outputs b if the first structure contains no paralogs (edges with a repeated name) and the second has no more than two paralogs for each edge. The algorithm has a multiplicative error of at most $13/9 + \varepsilon$, where ε is any strictly positive number, and its runtime is of the order of $n^{O(\varepsilon^{-2.6})}$, where n is the size of the initial pair of graphs. We also obtain algorithms for reconstruction of the evolution of genome structures with a condition on ancestor structures and along the phylogenetic tree.

Keywords: genome structure; genome rearrangements; genome transformation; DCJ operations; gene duplication; multiplicatively exact algorithm.

A *structure* is any directed graph in which the components are chains and cycles, and edges are assigned with names (in this respect, the graph is weighted). An edge is always considered in a pair with its name (but not with its direction). A structure describes a genome, where every component plays the role of a chromosome and every edge of the graph plays the role of a gene. Repetition of an edge consists in the presence of another edge with the same name in the structure; the number of allowed repetitions strongly influences the complexity of the problem. We consider the problems of transformation and reconstruction of structures, which consist in (1) finding *the shortest transformation* of one structure, *a*, into another, *b*, using pre-fixed operations over structures; and (2) finding *the shortest reconstruction* of structures specified at leaves of a tree at its interior vertices. Problem (2) is sometimes described as finding *the shortest arrangement* of structures specified at leaves of a tree over its interior vertices. In these problems, 'the shortest' means the minimum value of the corresponding functional. In the first case, the functional is the *total cost of the transformation* of *a* into *b*; in the second, *the total cost of arrangement* of structures over interior vertices of the tree. At the minimum point, the terms 'shortest cost' of a transformation/arrangement and, respectively, 'shortest transformation'/'shortest arrangement' are used. Thus, the two problems describe the evolution of genome structures, *a* into *b*, and reconstruction of the evolution along the phylogenetic tree of species. An edge with a repeated name in a structure is said to be *paralogic*, and each of its repetitions is called a *paralog* (of the corresponding edge). A star is a tree consisting of a root and edges leading from the root to leaves. A reconstruction (arrangement) is said to be *locally* shortest if at any single vertex of the tree, changing the structure in it to any other does not reduce the value of the functional. If two or more structures have no paralogs and sets of edge names in them are the same, these structures are said to have *equal content*; if there are no paralogs but the sets of edge names are not necessarily the same, they have *unequal content*. Structures where paralogs may occur but sets of names are the same will be called structures with *quasi-equal content*. DCJ operations allowed to be used to transform a structure a into b can be repeated unlimitedly many times in a sequence of intermediate structures from *a* to *b*. Each operation has its own cost, a strictly positive rational number. Here, again two cases are distinguished: costs of all operations are *equal* (in this case we may assume them to be equal to 1), or this is not so (*unequal costs*). Two cases of the transformation problem are distinguished: all structures have no paralogs, or paralogs are allowed; accordingly, we speak about the transformation problem *without* or *with paralogs*. The problem

with paralogs can be *reduced* by a linear complexity algorithm to an integer linear programming problem. When paralogs are allowed, this problem is NP-hard. For NP-hard problems, designing efficient approximate algorithms but with good accuracy is of importance. The efficiency assumes that the algorithm runtime is described by a low-degree polynomial; usually, of degree 1 or 2 in the size of initial data. Besides the algorithm mentioned in the abstract, we have obtained, in particular, the following results. For equal sets of names in the structures and equal operation costs, we have the following conditions on them: all structures are from one cycle, all are from one chain, all are from chains. For each of the conditions, we have obtained an exact (i.e., zero-error) algorithm for the transformation of a given *a* into a given *b* with quadratic runtime. For another list of operations (join and cut of a vertex, deletion and insertion of an edge) over structures and now arbitrary operation costs, we have obtained an algorithm for the extension of structures specified at leaves of a tree onto its interior vertices. The algorithm is exact if the tree is a star; in this case, structures in the leaves may even have unequal sets of names or paralogs. The runtime of the algorithm is of the order of $nX + n^2 log(n)$, where n is the number of names in the leaves and X is an easily computable characteristic of the structures at the leaves. In the general case, the algorithm finds a locally minimal solution, and its runtime is cubic.

Acknowledgments. This research was funded by the Russian Foundation for Basic Research under research project No. 18-29-13037.

УДК 544.165 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-209-211

РЕПОЗИЦИОНИРОВАНИЕ ЛЕКАРСТВ ДЛЯ ТЕРАПИИ COVID-19

Поройков В.В., Дружиловский Д.С., Савосина П.И., Гомазков О.А., Соболев Б.Н., Веселовский А.В., Тарасова О.А., Бизюкова Н.Ю., Ионов Н.С., Иванов С.М., Рудик А.В., Столбов Л.А., Погодин П.В., Карасев Д.А., Дмитриев Д.А., Лагунин А.А., Филимонов Д.А.

Институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича, Москва, Россия
119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8
e-mail: vvp1951@yandex.ru

Репозиционирование лекарств – выявление новых показаний у разрешенных к медицинскому применению лекарственных препаратов – является естественным оперативным ответом на вирусную инфекцию SARS-CoV-2/COVID-19. В докладе рассмотрено современное состояние поиска и разработки лекарственных препаратов для терапии COVID-19 с применением *in silico* и *in vitro* методов.

Ключевые слова: SARS-CoV-2; COVID-19; фармакологические мишени; репозиционирование лекарств; виртуальный скрининг; молекулярное моделирование; машинное обучение; исследования *in vitro*

Под репозиционированием лекарств понимают выявление новых показаний для разрешенных к медицинскому применению препаратов. Наличие информации о фармакологических и токсикологических характеристиках известного препарата обеспечивает условия для его быстрого применения по новой нозологии (Poroikov and Druzhilovskiy, 2019). Необходимость оперативного реагирования на пандемию COVID-19 стимулировала масштабные исследования в этом направлении. Поиск в Google по запросу «COVID-19 AND drug repurposing» дает около 5 миллионов документов. Лекарственные препараты Ремдесивир, Фавипиравир и Умифеновир (Арбидол) исходно разрабатывались для других показаний и были репозиционированы для терапии инфекции SARS-CoV-2. Сюда же можно отнести препараты Триазавирин, Нобазит, Нафамостат и ряд других, для которых в настоящее время проводятся клинические испытания на пациентах с COVID-19.
Для поиска новых фармакологических эффектов у известных лекарств проводят исследования *in silico* и *in vitro*. Компьютерные оценки получают путем моделирования взаимодействия анализируемых соединений с молекулярными мишенями, идентификацией аналогов на основе структурного сходства, анализом зависимостей «структура-активность» методами машинного обучения, установлением ассоциаций методами сетевой фармакологии (Muratov et al., 2021). Первоначальный отбор «хитов» проводят с помощью методов *in silico*, которые могут применяться к виртуальным (еще не синтезированным) молекулам, с последующей экспериментальной валидацией компьютерных предсказаний *in vitro*. Определение антикоронавирусной активности *in vitro* осуществляют с использованием биохимических и клеточных модельных систем (Savosina et al., 2021; Mslati et al., 2021). Предварительный отбор потенциально активных соединений на основе оценок *in silico* существенно повышает шансы на успех (Gentile et al., 2020).

Несколько масштабных экспериментальных исследований посвящены скринингу *in vitro* на одну или несколько мишеней от 1400 до 12000 лекарственных препаратов, что позволило отобрать ряд «кандидатов» для репозиционирования. Во многих случаях полученные для одних и тех же лекарственных препаратов в различных тест-системах результаты не согласуются друг с другом (Savosina et al., 2021; Mslati et al., 2021; Ionov et al., 2020), что объясняется отсутствием стандартизации тест-систем, которые разрабатываются различными исследователями независимо друг от друга, и общепринятых препаратов сравнения.
Как было отмечено авторами опубликованного недавно в журнале Chemical Society Reviews аналитического обзора по поиску антикоронавирусных соединений компьютерными методами: «… современные методы *in silico* дают возможность генерации экспериментально проверяемых гипотез, которые позволяют открывать новые лекарственные препараты и их комбинации, а открытая наука и быстрый обмен результатами исследований имеют решающее значение для ускорения разработки новых, столь необходимых терапевтических средств для борьбы с COVID-19” (Muratov et al., 2021). Поэтому для отбора наиболее перспективных препаратов с целью экспериментальной оценки возможностей их репозиционирования при SARS-CoV-2/COVID-19 на основе анализа обширных доступных данных необходима интеграция и анализ всей доступной информации, полученной с применением всей совокупности *in silico*, *in vitro* и *in vivo* методов.
В докладе обсуждаются возможности и ограничения репозиционирования лекарств в условиях пандемии COVID-19 и пути для снижения опасности новых биогенных угроз в будущем.
Работа выполняется при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Литература

1. *Gentile F., Agrawal V., Hsing M., Ton A. T., Ban F., Norinder U., Gleave M. E., Cherkasov A. Deep docking: A deep learning platform for augmentation of structure-based drug discovery. ACS Cent. Sci. 2020. Vol. 6. № 6. P. 939-949.*
2. *Ionov N., Pogodin P., Poroikov V. Assessing the prediction quality of the anti-SARS-CoV-2 activity using the D3Targets-2019-nCoV web service. Biomed. Chem. Res. & Meth. 2020. Vol. 3. № 4. P.e00140.*
3. *Mslati H., Gentile F., Perez C., Cherkasov A. Comprehensive consensus analysis of SARS-CoV-2 drug repurposing campaigns. J. Chem. Inf. Model. 2021. Vol. 61. № 8. P. 3771-3788.*
4. *Muratov E. N., Amaro R., Andrade C. H., Brown N., Ekins S., Fourches D., Isayev O., Kozakov D., Medina-Franco J., Merz K. M., Oprea T. I., Poroikov V., Schneider G., Todd M. H., Varnek A., Winkler D. A., Zakharov A., Cherkasov A., Tropsha A. A critical overview of computational approaches employed for COVID-19 drug discovery. Chem. Soc. Rev. 2021. Vol. 50. № 16. P. 9121-9151.*
5. *Poroikov V., Druzhilovskiy D. Drug repositioning: New opportunities for older drugs. In: In Silico Drug Design, 1st Edition. Repurposing Techniques and Methodologies. Chapter 1. Editor: Kunal Roy. Amsterdam: Elsevier, Academic Press. – 2019. - P.3-17.*
6. *Savosina P. I., Druzhilovskiy D. S., Poroikov V. V. COVID-19: Analysis of drug repositioning practice. Pharm. Chem. J. 2021. Vol. 54. № 10. P. 989-996.*

UDC 544.165 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-209-211

DRUG REPOSITIONING FOR THERAPY OF COVID-19

Poroikov V.V., Druzhilovskiy D.S., Savosina P.I., Gomazkov O.A., Sobolev B.N., Veselovsky A.V., Tarasova O.A., Biziukova N.Yu., Ionov N.S., Ivanov S.M., Rudik A.V., Stolbov L.A., Pogodin P.V., Karasev D.A., Dmitriev D.A., Lagunin A.A., Filimonov D.A.

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia
119121, Moscow, Pogodinskaya Str., 10, buildg. 8
e-mail: vvp1951@yandex.ru

Drug repositioning – the discovery of new indications for the launched drugs – is the rapid natural response to viral infection SARS-CoV-2/COVID-19. We will consider the current state of research and development of repositioned pharmaceuticals for the therapy of COVID-19 using *in silico* and *in vitro* methods.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; pharmacological targets; drug repositioning; virtual screening; molecular modeling; machine learning; *in vitro* testing

Repositioning of drugs is the discovery of new indications for drugs approved for medical use. The availability of information on a known drug's pharmacological and toxicological characteristics provides conditions for its rapid application for a new nosology (Poroikov and Druzhilovskiy, 2019). The need to respond quickly to the COVID-19 pandemic has spurred large-scale research in this direction. A Google search for "COVID-19 AND drug repurposing" yields about 5 million documents. Remdesivir, Favipiravir, and Umifenovir (Arbidol) were initially developed for other indications and repositioned to treat SARS-CoV-2 infection. The other examples are Triazavirin, Nobazit, Nafamostat etc., for which clinical trials are currently being conducted on patients with COVID-19.

To find new pharmacological effects of known drugs, *in silico* and *in vitro* studies are carried out. Computer estimates are obtained by modeling the interaction of analyzed compounds with molecular targets, identifying analogs based on structural similarity, analyzing structure-activity relationships using machine learning methods, and establishing associations using network pharmacology (Muratov et al., 2021). The initial selection of "hits" is carried out using *in silico* methods applied to virtual (not yet synthesized) molecules, followed by experimental validation of computational predictions *in vitro*. Determination of anticoronavirus activity *in vitro* is carried out using biochemical and cellular model systems (Savosina et al., 2021; Mslati et al., 2021). Pre-selection of potentially active compounds based on *in silico* evaluations significantly increases the chances of success (Gentile et al., 2020).

Several large-scale experimental studies are devoted to *in vitro* screening for one or several targets from 1400 to 12000 pharmaceuticals, making it possible to select some "candidates" for repositioning. In many cases, the results obtained for the same drugs in different test systems do not agree with each other (Savosina et al., 2021; Mslati et al., 2021; Ionov et al., 2020), which is explained by the lack of standardization of the test systems developed by various researchers independently of each other, and deficiency of generally accepted reference drugs.

As emphasized by the authors of an analytical review recently published in the Chemical Society Reviews on the computational approaches employed for COVID-19 drug discovery: "... truly impactful computational tools must deliver actionable, experimentally testable hypotheses enabling the discovery of novel drugs and drug combinations, and that open science and rapid sharing of research results are critical to accelerate the development of novel, much needed therapeutics for COVID-19" (Muratov et al., 2021). Therefore, to select the most promising drugs for experimental evaluation of their repositioning for therapy of SARS-CoV-2/COVID-19 based on the analysis of extensive available data, it is necessary to integrate and analyze all available information obtained so far using the entire set of *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* approaches.

We will discuss the possibilities and limitations of drug repositioning against the COVID-19 pandemic and ways to mitigate new biogenic threats in the future.

This study is carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

References

1. *Gentile F., Agrawal V., Hsing M., Ton A. T., Ban F., Norinder U., Gleave M. E., Cherkasov A. Deep docking: A deep learning platform for augmentation of structure-based drug discovery. ACS Cent. Sci. 2020. Vol. 6. № 6. P. 939-949.*
2. *Ionov N., Pogodin P., Poroikov V. Assessing the prediction quality of the anti-SARS-CoV-2 activity using the D3Targets-2019-nCoV web service. Biomed. Chem. Res. & Meth. 2020. Vol. 3. № 4. P.e00140.*
3. *Mslati H., Gentile F., Perez C., Cherkasov A. Comprehensive consensus analysis of SARS-CoV-2 drug repurposing campaigns. J. Chem. Inf. Model. 2021. Vol. 61. № 8. P. 3771-3788.*
4. *Muratov E. N., Amaro R., Andrade C. H., Brown N., Ekins S., Fourches D., Isayev O., Kozakov D., Medina-Franco J., Merz K. M., Oprea T. I., Poroikov V., Schneider G., Todd M. H., Varnek A., Winkler D. A., Zakharov A., Cherkasov A., Tropsha A. A critical overview of computational approaches employed for COVID-19 drug discovery. Chem. Soc. Rev. 2021. Vol. 50. № 16. P. 9121-9151.*
5. *Poroikov V., Druzhilovskiy D. Drug repositioning: New opportunities for older drugs. In: In Silico Drug Design, 1st Edition. Repurposing Techniques and Methodologies. Chapter 1. Editor: Kunal Roy. Amsterdam: Elsevier, Academic Press. – 2019. - P.3-17.*
6. *Savosina P. I., Druzhilovskiy D. S., Poroikov V. V. COVID-19: Analysis of drug repositioning practice. Pharm. Chem. J. 2021. Vol. 54. № 10. P. 989-996.*

УДК 575 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-212-214

TCR-PRED – ВЕБ-СЕРВИС ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЭПИТОПОВ ДЛЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ CDR3 Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ В ВИДЕ СТРУКТУРНЫХ ФОРМУЛ

Смирнов А.С.[1], **Рудик А.В.**[2], **Филимонов Д.А.**[2], **Лагунин А.А.**[1,2]

[1] ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Россия 117513, Москва, ул.Островитянова, д.1
[2] Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121, Москва, Россия
e-mail: anton.smirnov.9910@gmail.com

На основе информации из баз данных VDJdb и McPAS-TCR и модифицированной версии программы PASS создан новый веб-сервис, позволяющий предсказывать вероятность связывания Т-клеточных рецепторов с известными эпитопами по последовательности TCR-CDR3. Сервис доступен по ссылке: http://way2drug.com/TCR-pred/

Ключевые слова: TCR-pred, предсказание эпитопов, Т-клеточный рецептор (ТКР, TCR), TCR CDR3 аминокислотные последовательности.

Взаимодействие Т-клеточного рецептора (TCR) с пептидом, презентируемым главным комплексом гистосовместимости (MHC), является важным элементом работы иммунной системы, от которого зависит, будет ли инициирован иммунный ответ. TCR имеет 3 участка, определяющих комплементарность – CDR. К настоящему времени накоплено большое количество информации о распознавании различных эпитопов Т-клеточными рецепторами с разными CDR3 последовательностями, которые отвечают за контакт с антигеном.

Цель работы – создать веб-сервис, предсказывающий спектр эпитопов, который может распознать TCR с данной последовательностью CDR3. Он может быть использован для проектирования пептидных вакцин, специальных Т-клеток для уничтожения раковых клеток. Основу веб-сервиса составляет технология программы PASS[1], включающей использование Байес-подобного алгоритма и подструктурные атомно центрированные дескрипторы MNA (Multilevel Neighborhoods of Atoms) разного уровня для описания структурных формул аминокислотных последовательностей CDR3 участка TCR. Информация для обучающей выборки были взяты из баз данных VDJdb[2] и McPAS-TCR[3] (Таблица 1). Инвариантная точность предсказания (IAP), для классификационных моделей зависимости «структура-свойство» рассчитывалась при перекрестном контроле с разбиением на 20 частей, для каждого эпитопа рассчитаны средние величины IAP и их стандартное отклонение. Усредненные результаты валидации представлены в Таблице 2.

Таблица 1. Характеристики обучающей выборки.

Организм \ Цепь TCR	Количество уникальных CDR3 последовательностей		Количество уникальных эпитопов	
	α	β	α	β
Homo sapiens	20560	35560	165	254
Mus musculus	1224	2235	31	53

Таблица 2. Результаты валидации моделей.

Цепь TCR	Число эпитопов	Средний IAP	Стандартное отклонение IAP
α	30	0,895	0,009
β	83	0,901	0,011

На вход сервиса подается аминокислотная последовательность CDR3. В результате работы сервиса пользователю выдается таблица, содержащая список эпитопов и вероятность взаимодействия с ними Т-клеточного рецептора с последовательностью CDR3. Результат прогноза можно сохранить в файлах в форматах .xlsx, .csv, .pdf.

Литература

1. *Filimonov D.A., Druzhilovskiy D.S., Lagunin A.A., Gloriozova T.A., Rudik A.V., Dmitriev A.V., Pogodin P.V., Poroikov V.V. Computer-aided prediction of biological activity spectra for chemical compounds: opportunities and limitation // Biomedical Chemistry: Research and Methods. 2018. № 1(1). C. 1–20. DOI:10.18097/bmcrm00004.*
2. *Bagaev D. V., Vroomans R.M.A., Samir J., Stervbo U., Rius C., Dolton G., Greenshields-Watson A., Attaf M., Egorov E.S., Zvyagin I. V., Babel N., Cole D.K., Godkin A.J., Sewell A.K., Kesmir C., Chudakov D.M., Luciani F., Shugay M. VDJdb in 2019: Database extension, new analysis infrastructure and a T-cell receptor motif compendium // Nucleic Acids Research. 2020. № D1(48). C. D1057–D1062. DOI:10.1093/nar/gkz874.*
3. *Tickotsky N., Sagiv T., Prilusky J., Shifrut E., Friedman N. McPAS-TCR: a manually curated catalogue of pathology-associated T cell receptor sequences // Bioinformatics. 2017. № 18(33). C. 2924–2929. DOI:10.1093/bioinformatics/btx286.*

UDC 575 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-212-214

TCR-PRED – WEB SERVICE FOR PREDICTING THE SPECIFICITY OF EPITOPES FOR TCR CDR3 SEQUENCES BASED ON THEIR STRUCTURAL FORMULAS

Smirnov A.S.[1], **Rudik A.V.**[2], **Filimonov D.A.**[2], **Lagunin A.A.**[1,2]

[1] *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*
117513, Moscow, Ostrovityanova st, 1
[2] *Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia*
e-mail: anton.smirnov.9910@gmail.com

A new web-service predicting probability of T-cell receptor binding with major histocompatibility complex has been created based on the PASS software. Web-service is available on the link: http://way2drug.com/TCR-pred/index.php

Key words: TCR-pred, epitope prediction, T-cell, TCR CDR3 amino acid sequences

Interaction between T-cell receptor (TCR) with a peptide presented by major histocompatibility complex (MHC) is important part of immune system. Initiation of immune response depends on this event. A TCR has 3 complementarity-determining regions (CDR) and CDR3 is responsible for interaction with an epitope into a MHC. There is a lot of information about epitope recognition by CDR3 collecting into databases.

Table 1 – Characteristics of the training set

Organism \ TCR chain	Number of unique CDR3 sequences		Number of unique epitopes	
	α	β	α	β
Homo sapiens	20560	35560	165	254
Mus musculus	1224	2235	31	53

We created a new web-service (TCR-Pred) to predict probability of interaction between TCR with given CDR3 sequence and appropriate epitops. It can be used to design of peptide vaccines and T-cells for cancer cells destruction. Predictions are based on modified version of PASS software[1] and experimental data from VDJdb[2] and McPAS-TCR[3] databases. PASS software is based on Bayesian like algorithm and substructural atom centric descriptors - MNA (Multilevel Neighborhoods of Atoms) different levels for description of structures of TCR CDR3 amino acid sequences. Information for a training set was selected from VDJdb and McPAS-TCR

databases (Table 1). Invariant Accuracy of Prediction (IAP), which is equal to AUC ROC, was calculated for models by leave-one-out. Final models have been validated 20 times for calculating mean and standard deviation of an IAP. Validation results are represented in Table 2.

Table 2 – The results of 20-fold cross-validation

TCR chain	Number of epitopes	IAP mean	IAP standard deviation
α	30	0,895	0,009
β	83	0,901	0,011

TCR CDR3 sequence(s) in text format is used as a query in TCR-Pred service. The output is a table with calculated probability of epitopes, which can interact with a query TCR CDR3 sequence. The result of prediction can be downloaded as .xlsx, .csv, .pdf files.

References

1. *Filimonov D.A., Druzhilovskiy D.S., Lagunin A.A., Gloriozova T.A., Rudik A.V., Dmitriev A.V., Pogodin P.V., Poroikov V.V. Computer-aided prediction of biological activity spectra for chemical compounds: opportunities and limitation // Biomedical Chemistry: Research and Methods. 2018. № 1(1). C. 1–20. DOI:10.18097/bmcrm00004.*
2. *Bagaev D. V., Vroomans R.M.A., Samir J., Stervbo U., Rius C., Dolton G., Greenshields-Watson A., Attaf M., Egorov E.S., Zvyagin I. V., Babel N., Cole D.K., Godkin A.J., Sewell A.K., Kesmir C., Chudakov D.M., Luciani F., Shugay M. VDJdb in 2019: Database extension, new analysis infrastructure and a T-cell receptor motif compendium // Nucleic Acids Research. 2020. № D1(48). C. D1057–D1062. DOI:10.1093/nar/gkz874.*
3. *Tickotsky N., Sagiv T., Prilusky J., Shifrut E., Friedman N. McPAS-TCR: a manually curated catalogue of pathology-associated T cell receptor sequences // Bioinformatics. 2017. № 18(33). C. 2924–2929. DOI:10.1093/bioinformatics/btx286.*

БИОЭКОНОМИКА

BIOECONOMICS

БИОАНАЛИТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ: НОВЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ И СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

BIOANALYTIC TECHNOLOGIES IN MEDICINE AND AGRICULTURE

1. СПОСОБЫ СНИЖЕНИЯ ПРЕДЕЛА ОБНАРУЖЕНИЯ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ КОНТРОЛЯ АНТИБИОТИКОВ В МЕДЕ
Л.В. Баршевская, Д. Сотников, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев 219

METHODS FOR REDUCING THE DETECTION LIMIT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS FOR ANTIBIOTIC CONTROL IN HONEY
L. Barshevskaya, D. Sotnikov, A. Zherdev, B. Dzantiev 220

2. ОТЖИГ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ШПИЛЕК КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК АМПЛИФИКАЦИОННОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОРНК, ОСНОВАННОГО НА РЕАКЦИИ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СБОРКИ ШПИЛЕК
О.Л. Бодулев, И.Ю. Сахаров 221

ANNEALING OF OLIGONUCLEOTIDE HAIRPINS AS EFFECTIVE APPROACH TO IMPROVE THE ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF AMPLIFICATION METHOD FOR MICRORNA DETERMINATION BASED ON CATALYTIC HAIRPIN ASSEMBLY REACTION
O.L. Bodulev, I.Y. Sakharov 221

3. СРАВНЕНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ И МИКРОПЛАНШЕТОВ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ В ГЕТЕРОГЕННОМ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОМ АНАЛИЗЕ МИКРОРНК-141 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СБОРКИ ШПИЛЕК
К.М.Буркин, О.Л.Бодулев, Ш. Разо, А.В.Иванов, И.В.Сафенкова, И.Ю.Сахаров 222

COMPARISON OF MAGNETIC NANOPARTICLES AND MICROPLATES AS CARRIERS IN HETEROGENEOUS CHEMILUMINESCENT ASSAY OF MICRORNA-141 USING CATALYTIC HAIRPIN ASSEMBLY
K.Burkin, O.Bodulev, S.Razo, A.Ivanov, I.Safenkova, I.Sakharov 223

4. АНАЛИТИЧЕСКОЕ РЕШЕНИЕ ДЛЯ БЕЗОПАСНОГО ГРУДНОГО ВСКАРМЛИВАНИЯ. ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МАКРОЛИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ В МАТЕРИНСКОМ МОЛОКЕ
Буркин М.А., Гальвидис И.А., Райсян А., Шнайдер Р., Еремин С.А. 224

ANALYTICAL SOLUTION FOR SAFE BREASTFEEDING. IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY OF MACROLIDE ANTIBIOTICS IN MOTHER'S MILK
Burkin M.A, Galvidis I.A, Raysyan A., Schneider R.J., Eremin S.A. 225

5. ИЗУЧЕНИЕ ВИРОМА ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОЛЛЕКЦИЙ ВИНОГРАДА
Виноградова С.В. 226

VIROME OF GRAPEVINE GENETIC COLLECTIONS
Vinogradova S.V. 227

6. ПОДХОДЫ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЭКСПРЕССНЫХ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ
Дзантиев Б.Б. 229

APPROACHES FOR IMPROVING SENSITIVITY OF RAPID IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS
Dzantiev B.B. 230

7. ПРОБЛЕМЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КАРАНТИННЫХ ФИТОБАКТЕРИОЗОВ
Дренова Н.В., Джалилов Ф.С. 227

PROBLEMS OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF THE CAUSAL AGENTS OF QUARANTINE PHYTOBACTERIOSIS
Drenova N.V., Dzhalilov F.S. 228

8. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЕ СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ИНСЕКТИЦИДОВ
Шамагсумова Р.В., Евтюгин Г.А. 231

ELECTROCHEMICAL ACETYLCHOLINESTERASE SENSORS BASED ON CARBON NANOMAERIALS FOR THEDETERMINATION OF DRUGS AND INSECTICIDES
Shamagsumova R.V., Evtugyn G.A. 232

9.РАЗРАБОТКА ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА ФТАЛАТОВ: СРАВНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ АНТИТЕЛ И ТРЕЙСЕРОВ
Еремин С.А., Шанин И.А., Каримова М.Р. , Мухаметова Л.И. 232

DEVELOPMENT OF FLUORESCENCE POLARIZATION IMMUNOASSAY OF PHTHALATES: COMPARISON OF DIFFERENT DERIVATIVES IN OBTAINING ANTIBODIES AND TRACERS
Eremin S.A., Shanin I.A., Karimova M.R., Mukhametova L.I. 233

10. ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ПЕНИЦИЛЛИНОВ В МОЛОЧНОЙ И МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ
Куприенко О.С., Зильберман А.И., Вашкевич И.И., Свиридов О.В. 234

HIGHLY SENSITIVE IMMUNOASSAY OF PENICILLINS IN DAIRY AND MEAT PRODUCTS
Kuprienko O.S., Zilberman A.I., Vashkevich I.I., Sviridov O.V. 235

11. ДЕЗОКСИУРИДИНТРИФОСФАТЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ АРОМАТИЧЕСКИМИ ГРУППАМИ ТИРОЗИНА, ДЛЯ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ РЕКОМБИНАЗНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК
Г.Р. Кутдусова, Е.В. Супрун 236

DEOXYURIDINE TRIPHOSPHATES MODIFIED WITH AROMATIC TYROSINE GROUPS FOR ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION PRODUCTS OF DNA
G. Kutdusova, E. Suprun 237

12. БИОСЕНСОРИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ДИАГНОСТИКА НА БАЗЕ УЛЬТРАЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ОПТИЧЕСКИХ И МАГНИТНЫХ МЕТОДОВ ИЗМЕРЕНИЙ
Никитин П.И., Орлов А.В., Брагина В.А., Гутенева Н.В., Никитин М.П., Горшков Б.Г. 238

BIOSENSING AND MEDICAL DIAGNOSTICS BASED ON ULTRA SENSITIVE OPTICAL AND MAGNETIC MEASUREMENTS
Nikitin P.I., Orlov A.V., Bragina V.A., Gyteneva N.V., Nikitin M.P., Gorshkov B.G. 239

13. МОДУЛЯЦИЯ СВОЙСТВ АПТАМЕРНЫХ АНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ С ПОМОЩЬЮ КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ
Самохвалов А.В., Сафенкова И.В., Еремин С.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. 240

MODULATION OF APTAMERIC ANALYTICAL SYSTEMS PROPERTIES USING COMPLEMENTARY OLIGONUCLEOTIDES
Samokhvalov A.V., Safenkova I.V., Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. 241

14. АНАЛИТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАЗНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ЭКСПРЕССНОЙ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСНЫХ, ВИРОИДНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ РАСТЕНИЙ
Сафенкова И.В., Иванов А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. 242

ANALYTICAL SYSTEMS BASED ON RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION FOR RAPID DETECTION OF VIRAL, VIROID AND BACTERIAL PLANT PATHOGENS
Safenkova I.V., Ivanov A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. 243

15. ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ МИКРОРНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИЗОТЕРМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ
Сахаров И.Ю., Бодулев О.Л., Соловьев А.М. 244

HIGHLY SENSITIVE METHODS FOR MICRORNA DETECTION USING ISOTHERMAL METHODS FOR NUCLEIC ACIDS AMPLIFICATION
Sakharov I.Yu., Bodulev O.L., Soloviev A.M. 245

16. МОНИТОРИНГ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ РЕЦЕПТОРА БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ В ПРОЦЕССАХ ЕГО ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ, ВЫДЕЛЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ В АНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ
Серченя Т.С., Семижон П.А., Счесленок Е.П., Горбачева И.В., И.И. Вашкевич, Свиридов О.В. 246

MONITORING OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF BETA-LACTAM ANTIBIOTICS RECEPTOR BlaR-CTD IN THE PROCESSES OF ITS HETEROLOGICAL EXPRESSION, PURIFICATION AND APPLICATION IN ANALYTICAL SYSTEMS
SerchenyaT.S., Semizhon P.A., Scheslenok H.P., Harbachova I.V., Vashkevich I.I., SviridovO.V. 247

17. ДЕЗОКСИУРИДИНТРИФОСФАТЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ АРОМАТИЧЕСКИМИ ГРУППАМИ ТИРОЗИНА ИЛИ ТРИПТОФАНА, ДЛЯ ПРЯМОГО ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДВУНИТЕВЫХ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК
Супрун Е.В., Хмелёва С.А., Кутдусова Г.Р., Дускаев И.Ф., Птицын К.Г., Кузнецова В.Е., Лапа С.А., Чудинов А.В., Радько С.П. 248

DEOXYURIDINE TRIPHOSPHATES MODIFIED WITH AROMATIC GROUPS OF TYROSINE OR TRYPTOPHAN FOR DIRECT ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF DOUBLE-STRANDED DNA AMPLIFICATION PRODUCTS
Suprun E.V., Khmeleva S.A., Kutdusova G.R., Duskaev I.F., Ptitsyn K.G., Kuznetsova V.E., Lapa S.A., Chudinov A.V., Radko S.P. 249

18. ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТРЕССОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА ЖИВЫЕ СИСТЕМЫ
Угарова Н.Н., Ломакина Г.Ю. 250

APPLICATION OF BIOLUMINESCENT METHODS TO STUDY STRESS EFFECTS ON LIVING SYSTEMS
Ugarova N.N., Lomakina G.Yu. 251

19. ГИБРИДИЗАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ НА КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИХ БИОЧИПАХ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ У БАКТЕРИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К АНТИБИОТИКАМ
Филиппова А.А., Рубцова М.Ю., Фурсова Н.К., Преснова Г.В., Уляшова М.М., Григоренко В.Г., Егоров А.М. 252

HYBRIDIZATION ANALYSIS ON COLORIMETRIC BIOCHIPS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF BETA-LACTAMASE GENES IN ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIA
Filippova A.A., Rubtsova M.Yu., Fursova N.K., Presnova G.V., Ulyashova M.M., Grigorenko V.G., Egorov A.M. 253

20. РАМАНОВСКИЕ МЕТКИ С УСИЛЕНИЕМ ПОЛЯ В ЗАЗОРЕ ДЛЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ И БИОИМИДЖИНГА
Хлебцов Б.Н., Ханадеев В.А., Буров А.М., Хлебцов Н.Г. 254

GAP-ENHANCED RAMAN TAGS FOR ANALITICAL AND BIOIMAGING APPLICATIONS
Khlebtsov B.N., Khanadeev V.A., Burov A.M., Khlebtsov N.G. 254

21. ВЫЯВЛЕНИЕ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ОТВЕТА К РЕКОМБИНАНТНОМУ БЕЛКУ DNAK CHLAMYDIA PSITTACI МЕТОДОМ DOT-ELISA
Ляпина А.М., Хижнякова М.А., Кичемазова Н.В., Колосова А.А., Евстифеев В.В., Ларионова О.С., Федорова В.А. 255

DETECTION OF SEROLOGICAL RESPONSE TO THE RECOMBINANT CHLAMYDIA PSITTACI PROTEIN DNAK USING DOT-ELISA TECHNIQUE
Lyapina A.M., Khizhnyakova M.A., Kichemazova N. V., Kolosova A.A., Evstifeev V.V., Larionova O.S., Feodorova V.A. 256

22. РАСПРОСТРАНЕНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА GRAPEVINE PINOT GRIS VIRUS В РОССИИ
Д.А. Швец, С.В. Виноградова 257

OCCURRENCE AND MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF GRAPEVINE PINOT GRIS VIRUS IN RUSSIA
D. Shvets, S. Vinogradova 258

23. ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В РАЗВИТИИ РЯДА АКТУАЛЬНЫХ ОБЛАСТЕЙ БИОЭКОНОМИКИ
Шишкин С.С., Титова Е.С. 259

OMICS TECHNOLOGIES IN THE DEVELOPMENT OF A NUMBER TOPICAL FIELDS IN BIOECONOMY
Shishkin S.S., Titova E.S. 260

24. ЭЛЕКТРОАНАЛИЗ В ПОСТГЕНОМНУЮ ЭРУ: РЕЗУЛЬТАТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ
Шумянцева В.В., Булко Т.В., Кузиков А.В., Масамрех Р.А., Королева П.И., Агафонова Л.Е., Гилеп А.А., Усанов С.А. 261

ELECTROANALYSIS IN POSTGENOMIC ERA: RESULTS AND PERSPECTIVES
Shumyantseva V.V. , Bulko T.V., Kuzikov A.V., Masamrech R.A., Agafonova L.E., Gilep A.A., Usanov S.A. 262

УДК: УДК 57.083.3 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-219-220

СПОСОБЫ СНИЖЕНИЯ ПРЕДЕЛА ОБНАРУЖЕНИЯ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ КОНТРОЛЯ АНТИБИОТИКОВ В МЕДЕ

Л.В. Баршевская, Д. Сотников, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев

Институт биохимии им А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Россия, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33 стр. 2, lyubov.barshevskaya@yandex.ru, 8-915-982-57-10

Предложены способы повышения чувствительности иммунохроматографических тест-систем для определения низкомолекулярных аналитов. Разработанные схемы анализа апробированы при определении сульфониламида и хлорамфеникола в меде.

Ключевые слова: наночастицы золота; иммунохроматография; сульфониламид; хлорамфеникол.

Снижение пределов обнаружения иммунохроматографических тест-систем (ИХТС) остается актуальной задачей, несмотря на многолетнее использование метода. Существующие подходы часто значительно усложняют проведение тестирования, поскольку требуют дополнительных реагентов и манипуляционных стадий. Задачей данного исследования стала разработка простых способов снижения пределов обнаружения ИХТС, реализованных на примерах определения антибиотиков.

С целью поиска новых способов снижения предела обнаружения были созданы математические модели ИХТС с разными схемами формирования детектируемых иммунных комплексов. Моделирование проводили численными методами с использованием программного пакета COPASI. В результате исследования разработанных моделей была предложена новая схема проведения иммунохроматографии с двойной конкуренцией, для которой модель предсказывала снижение предела обнаружения по сравнению с традиционной схемой. Для проверки правильности расчётов созданы экспериментальные образцы ИХТС по предложенной схеме.

С целью поиска новых способов снижения предела обнаружения были созданы математические модели ИХТС с разными схемами формирования детектируемых иммунных комплексов. Моделирование проводили численными методами с использованием программного пакета COPASI. В результате исследования разработанных моделей была предложена новая схема проведения иммунохроматографии с двойной конкуренцией, для которой модель предсказывала снижение предела обнаружения по сравнению с традиционной схемой. Для проверки правильности расчётов созданы экспериментальные образцы ИХТС по предложенной схеме.

Предложенный способ основан на проведении анализа в условиях двойной конкуренции, когда специфические антитела против определяемого соединения иммобилизованы и на поверхности маркерных частиц, и в тестовой зоне рабочей мембраны. При проведении анализа согласно предложенной схеме происходит более эффективное подавление образования окрашенного комплекса в тестовой зоне, чем при использовании стандартных форматов конкурентной иммунохроматографии. Это приводит к снижению предела определения целевого аналита, поскольку его появление в пробе подавляет взаимодействия антител как с маркером, так и с антигеном в аналитической зоне (тогда как в традиционных форматах анализа конкуренция происходит только на одной стадии). Апробация предложенной схемы проводилась для проб меда, содержавших хлорамфеникол. Визуальный предел детекции хлорамфеникола составил 10 нг/мл, что в 10 раз ниже по сравнению с традиционной схемой анализа на основе тех же иммунореагентов. При цифровой регистрации предел обнаружения хлорамфеникола составил 0,01 нг/мл.

Также в ходе исследования формат непрямой конкурентной иммунохроматографии, ранее разработанный в лаборатории, был применен для нового объекта - сульфониламида. Данный формат позволяет преодолеть ограничения традиционного конкурентного анализа с использзованием ИХТС, которые заключаются в невозможности независимого варьирования концентрации маркерных наночастиц и специфических антител, иммобилизованных на этих наночастицах. При непрямом мечении вместо одного компонента тест-системы - маркера со специфическими антителами – используют два независимых реагента – свободные специфические антитела и конъюгаты наночастиц с иммуноглобулин-связывающим белком. Эффективность предложенного подхода показана на примере определения сульфониламида в меде. При цифровой регистрации предел обнаружения сульфониламида в мёде составил 0,37 нг/мл. Визуальный

предел обнаружения сульфониламида, соответствовавший исчезновению окрашивания в аналитической зоне ИХТС, составил 100 нг/мл.

Полученные результаты свидетельствуют об эффективности предложенных подходов для высокочувствительного и простого определения низкомолекулярных аналитов.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 20-76-10033).

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-219-220

METHODS FOR REDUCING THE DETECTION LIMIT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS FOR ANTIBIOTIC CONTROL IN HONEY

L. Barshevskaya, D. Sotnikov, A. Zherdev, B. Dzantiev

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences, Россия, 119071, Moscow, Leninsky prospect, 33

Methods for increasing the sensitivity of immunochromatographic test systems for the determination of low molecular weight analytes are proposed. The developed analysis schemes were tested in the determination of sulfonylamide and chloramphenicol in honey.

Key words: gold nanoparticles; immunochromatography; sulfonylamide; chloramphenicol.

Reducing the detection limits of immunochromatographic test systems (ICTS) remains an urgent task, despite the long-term use of the method. Existing approaches often significantly complicate testing as they require additional reagents and manipulation steps. The aim of this study was to develop simple methods for lowering the detection limits of ICTS, implemented using examples of the determination of antibiotics.

In order to search for new ways to reduce the detection limit, mathematical models of ICTS with different schemes for the formation of detectable immune complexes were created. Modeling was carried out by numerical methods using the COPASI software package. As a result of the study of the developed models, a new scheme for conducting immunochromatography with double competition was proposed, for which the model predicted a decrease in the detection limit compared to the traditional scheme. To check the correctness of the calculations, experimental ICTS samples were created according to the proposed scheme.

The proposed method is based on the analysis under conditions of double competition, when specific antibodies against the compound to be determined are immobilized both on the surface of the marker particles and in the test zone of the working membrane. When the analysis is carried out according to the proposed scheme, the formation of a colored complex in the test zone is suppressed more efficiently than when standard formats of competitive immunochromatography are used. This leads to a decrease in the detection limit of the target analytes, since its appearance in the sample suppresses the interaction of antibodies with both the marker and the antigen in the analytical zone (whereas in traditional analysis formats, competition occurs only at one stage). The proposed scheme was tested for honey samples containing chloramphenicol. The visual limit of chloramphenicol detection was 10 ng / ml, which is 10 times lower compared to the traditional analysis scheme based on the same immunoreagents. With digital registration, the detection limit of chloramphenicol was 0.01 ng / ml.

Also in the course of the study, the format of indirect competitive immunochromatography, previously developed in the laboratory, was applied to a new object - sulfonylamide. This format makes it possible to overcome the limitations of traditional competitive analysis using ICTS, which are the impossibility of independently varying the concentration of marker nanoparticles and specific antibodies immobilized on these nanoparticles. In indirect labelling, instead of one component of the test system - a marker with specific antibodies - two independent reagents are used - free specific antibodies and conjugates of nanoparticles with an immunoglobulin-binding protein. The effectiveness of the proposed approach is shown by the example of the determination of sulfonylamide in honey. With digital registration, the detection limit of sulfonylamide in honey was 0.37 ng / ml. The visual limit of detection for sulfonylamide, corresponding to the disappearance of color in the analytical zone of the ICTS, was 100 ng / ml.

The results obtained indicate the effectiveness of the proposed approaches for the highly sensitive and simple determination of low molecular weight analytes.

Grant: This work was supported by the Russian Science Foundation (grant 20-76-10033).

УДК 543.94 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-221-222

ОТЖИГ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ШПИЛЕК КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК АМПЛИФИКАЦИОННОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОРНК, ОСНОВАННОГО НА РЕАКЦИИ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СБОРКИ ШПИЛЕК

О.Л. Бодулев, И.Ю. Сахаров

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
119991, Москва, Ленинские горы, 1 стр.11Б
e-mail: bodulevoleg@mail.ru

В работе представлен новый подход для снижения фоновой реакции амплификационного метода каталитической сборки шпилек, основанный на оптимизации условий отжига олигонуклеотидных зондов шпилечной структуры. Данный подход позволил улучшить аналитические характеристики амплификационного метода определения микроРНК, основанного на реакции каталитической сборки шпилек.

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, методы изотермической амплификации, метод каталитической сборки шпилек, микроРНК

Метод каталитической сборки шпилек (КСШ) является хорошо известным методом изотермической амплификации нуклеиновых кислот и на сегодняшний день широко используется при разработке новых биоаналитических методов определения нуклеиновых кислот. В отличие от других амплификационных методов в КСШ не используются ферменты, благодаря чему метод является недорогостоящим и простым в исполнении. Реакция КСШ основывается на катализируемом специфичным ДНК/РНК олигонуклеотидом комплементарном взаимодействии двух ДНК-зондов шпилечной структуры. Фактором, существенно ограничивающим эффективность КСШ, является значительная фоновая реакция (реакция зондов в отсутствии аналита). Ранее было предложено несколько подходов для снижения этой реакции, однако полностью проблема фоновой реакции осталась не решенной. В нашей работе впервые было продемонстрировано влияние условий отжига используемых в КСШ олигонуклеотидных зондов на степень проведения фоновой реакции. Применение разработанного подхода при разработки планшетного хемилюминесцентного метода определения микроРНК-141, основанного на КСШ, позволило снизить предел обнаружения анализа в 100 раз, а также в два раза повысить коэффициент чувствительности определения аналита [1].

Авторы благодарят РФФИ за финансовую поддержку гранта 21-54-53007

Литература

1. *Bodulev O. L., Zhao S., Sakharov I. Y. Improving the Sensitivity of the miRNA Assay Coupled with the Mismatched Catalytic Hairpin Assembly Reaction by Optimization of Hairpin Annealing Conditions //Analytical Chemistry. 2021. Vol. 93. № 17. P. 6824-6830.*

UDK 543.94 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-221-222

ANNEALING OF OLIGONUCLEOTIDE HAIRPINS AS EFFECTIVE APPROACH TO IMPROVE THE ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF AMPLIFICATION METHOD FOR MICRORNA DETERMINATION BASED ON CATALYTIC HAIRPIN ASSEMBLY REACTION

O.L. Bodulev, I.Y. Sakharov

Chemistry Department of Moscow State University, Moscow, Russia
119991, Moscow, Leninsky Gory, 1 bldg. 11B
e-mail: bodulevoleg@mail.ru

This work presents a new approach for reducing the background reaction of the catalytic hairpin assembly (CHA)

amplification method, based on optimizing the conditions for annealing of hairpin oligonucleotide probes. This approach made it possible to improve the analytical characteristics of the amplified CHA-based method for microRNAs quantitation.

Key words: nucleic acids, isothermal amplification methods, catalytic assembly method, hairpins, microRNA

Catalytic hairpin assembly (CHA) is a well-known method for isothermal amplification of nucleic acids and is widely used currently in the development of new bioanalytical methods for the determination of nucleic acids. Unlike other amplification methods, CHA does not use enzymes, which makes the method inexpensive and easy to use. The CHA reaction is based on a complementary interaction of two DNA hairpin probes catalyzed by a specific DNA/RNA oligonucleotide. The factor limiting the effectiveness of CHA is a significant background response (interaction of the hairpin probes in the absence of an analyte). Previously, several approaches have been proposed to prevent this reaction, but the problem of the background reaction has not been completely solved. In our work, we demonstrated for the first time the influence of the CHA oligonucleotide probes annealing conditions on the degree of the background reaction. The use of the developed approach in the microplate chemiluminescent method for the determination of miRNA-141 coupled with CHA made it possible to 100 times reducing the detection limit of the assay, and also to double the analyte detection sensitivity coefficient [1].

The authors are grateful to the Russian Foundation for Basic Research for financial support of the grant 21-54-53007.

References

1. *Bodulev O. L., Zhao S., Sakharov I. Y. Improving the Sensitivity of the miRNA Assay Coupled with the Mismatched Catalytic Hairpin Assembly Reaction by Optimization of Hairpin Annealing Conditions //Analytical Chemistry. 2021. Vol. 93. № 17. P. 6824-6830.*

УДК 543.95, ББК: 28.087 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-222-224

СРАВНЕНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ И МИКРОПЛАНШЕТОВ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ В ГЕТЕРОГЕННОМ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОМ АНАЛИЗЕ МИКРОРНК-141 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СБОРКИ ШПИЛЕК

К.М. Буркин[1], О.Л. Бодулев[1, 2], Ш. Разо[2], А.В. Иванов[2], И.В. Сафенкова[2], И.Ю. Сахаров[3]

[1] *Химический факультет, МГУ им. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, burkin-kost@yandex.ru, 8 (495) 939-15-97*
[2] *Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, 119071, Москва, Ленинский пр., 33*
[3] *Химический факультет, МГУ им. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1*

Проведено сравнение двух типов носителей (магнитных наночастиц и микропланшета) для детекции олигонуклеотидов. В хемилюминесцентном гетерогенном методе детекции микроРНК-141 с использованием изотермической реакции каталитической сборки шпилек показано, что значение аналитических параметров не зависело от выбора носителя.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, микропланшет, нуклеиновые кислоты, метод каталитической сборки шпилек

Биотехнологические методы, направленные на детекцию нуклеиновых кислот, ежедневно используются в различных сферах, таких как клиническая диагностика, судмедэкспертиза, пищевая промышленность и т.д. Наибольшее распространение для решения рутинных аналитических задач получили гетерогенные методы анализа, предполагающие сепарацию детектируемого компонента на нерастворимом носителе. Часто в качестве носителей используют коммерчески доступные 96-луночные планшеты, работа с которыми проста и может быть автоматизирована. Другим широко используемым вариантом но-

сителей являются магнитные наночастицы (МНЧ), за счет применения которых можно достичь бóльшей суммарной площади поверхности гетерогенной реакции, что является потенциальным преимуществом для гетерогенного анализа. При этом относительно наночастиц другой химической природы МНЧ обладают преимуществом простой магнитной сепарации. Однако прямые сравнения двух типов носителей для детекции олигонуклеотидов ранее не проводились.

В данной работе проведено сравнение 96-луночного планшета и МНЧ, использованных в хемилюминесцентном гетерогенном методе детекции микроРНК-141 (маркера онкологических заболеваний). Для амплификации аналитического сигнала в данном методе анализа использовалась изотермическая реакция каталитической сборки шпилек (КСШ). Схема анализа включала связывание антителами против флуоресцеина (antiFlu), иммобилизованными на носителе, двуцепочечного олигонуклеотида, меченого по двум концам флуоресцеином и биотином с последующим добавлением конъюгата стрептавидин-полипероксидазы. На завершающем этапе анализа проводилась детекция пероксидазной активности с помощью хемилюминесцентной реакции.

Для синтеза 5 конъюгатов МНЧ (средний диаметр частицы – 440 нм) с antiFlu(МНЧ-antiFlu) в реакционном растворе варьировали соотношение количества антител и частиц. Количество антител, используемое в синтезе, было эквивалентно 17, 35, 70, 100 и 120% от необходимого для полного покрытия поверхности МНЧ. Сравнение конъюгатов показало, что МНЧ-antiFlu, синтезированный при 120% количестве антител, обеспечивает наибольший сигнал в анализе. Варьирование концентрации выбранного конъюгата в реакционной среде показало, что максимальный сигнал регистрируется при концентрации МНЧ-antiFlu, равной $2*10^9$ частиц в 1 мл. При данной концентрации МНЧ-antiFlu величина сигнала соответствовала величине сигнала, регистрируемого в лунках планшета. В этих условиях суммарная площадь поверхности МНЧ в реакции была сопоставима с площадью лунки планшета и равнялась 65 мм^2. Таким образом, в рассматриваемом гетерогенном анализе увеличение площади поверхности (за счет увеличения количества МНЧ) не приводило к увеличению детектируемого сигнала.

Сравнение калибровочных кривых для микроРНК-141 методом КСШ на двух носителях показало одинаковые значения пределов обнаружения – 20 пМ. Применение МНЧ предполагало использование дополнительного оборудования, такого как шейкер и вортекс для равномерного распределения МНЧ в проводимых реакциях, которое не нужно для планшетного формата анализа. При этом для получения конъюгатов МНЧ-antiFlu было необходимо проводить синтез, в то время как для планшета иммобилизация проводилась сорбцией в течение ночи. Таким образом, оба носителя могут быть использованы для гетерогенных методов анализа, однако выбор носителя зависит от задач и оснащения конкретных лабораторий.

Финансирование: Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта РФФИ № 21-54-53007.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-222-224

COMPARISON OF MAGNETIC NANOPARTICLES AND MICROPLATES AS CARRIERS IN HETEROGENEOUS CHEMILUMINESCENT ASSAY OF MICRORNA-141 USING CATALYTIC HAIRPIN ASSEMBLY

K. Burkin[1], O. Bodulev[1], S. Razo[2], A. Ivanov[2], I. Safenkova[2], I. Sakharov[3]

[1] *Chemical Faculty, Lomonosov Moscow State University, Russia, 119991, Moscow, Leninskie Gory, 1*
[2] *A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the RAS, Russia, 119071, Moscow, Leninsky pr., 33*
[3] *Chemical Faculty, Lomonosov Moscow State University, Russia, 119991, Moscow, Leninsky Gory, 1*

Comparison of two types of carriers (magnetic nanoparticles and microplate) for the detection of oligonucleotides is carried out. It was shown that the value of analytical parameters in chemiluminescent heterogeneous assay of microRNA-141 using an isothermal reaction of catalytic hairpin assembly did not depend on the choice of the carrier.

Key words: magnetic nanoparticles, microplate, nucleic acids, catalytic hairpin assembly

Biotechnological methods aimed at the detection of nucleic acids are used every day in various fields, such as clinical diagnostics, forensic science, food industry, etc. The most widespread methods for solving routine

analytical problems are heterogeneous assays, which involve the separation of the detected component on an insoluble carrier. Often, commercially available 96-well plates are used as carriers, working with which is simple and can be automated. Another widely used variant of carriers is magnetic nanoparticles (MNP), due to the use of which it is possible to achieve a large total surface area of the heterogeneous reaction, which is a potential advantage for heterogeneous analysis. In this case, relative to nanoparticles of a different chemical nature, MNP have the advantage of a simple magnetic separation. However, direct comparisons of the two types of carriers for the detection of oligonucleotides have not previously been performed.

In this work, a comparison was made between a 96-well plate and MNP used in the chemiluminescent heterogeneous detection method of microRNA-141 (a marker of oncological diseases). To amplify the analytical signal in this assay, the isothermal reaction of the catalytic hairpin assembly (CHA) was used. The assay scheme included binding by anti-fluorescein antibodies (antiFlu) immobilized on a carrier to a double-stranded oligonucleotide labeled with fluorescein at one end and with biotin at the other, followed by the addition of a streptavidin-polyperoxidase conjugate. At the final stage of the analysis, peroxidase activity was detected using a chemiluminescent reaction.

For the synthesis of 5 conjugates of MNP (average particle diameter of 440 nm) with antiFlu (MNP-antiFlu), the ratio of antibodies to particles in the reaction solution was varied. The number of antibodies used in the synthesis was equivalent to 17, 35, 70, 100, and 120% of required for complete coverage of the MNP surface. Comparison of the conjugates showed that MNP-antiFlu synthesized at 120% quantity of antibodies provides the highest signal in the assay. Varying the concentration of the selected conjugate in the reaction medium showed that the maximum signal is recorded at a concentration of MNP-antiFlu equal to $2*10^9$ particles per ml. At a chosen concentration of MNP-antiFlu, the signal magnitude corresponded to the signal magnitude recorded in the plate wells. Under these conditions, the total surface area of MNP in the reaction was comparable to the area of the well and was equal to 65 mm^2. Thus, in the considered heterogeneous analysis, an increase in the surface area (due to an increase in the number of MNP-antiFlu) did not lead to an increase in the detected signal.

Comparison of the calibration curves for microRNA-141 by the CHA method on two carriers showed the same values of the detection limits - 20 pM. The use of MNP presupposed the use of additional equipment, such as shaker and vortex for uniform distribution of MNP in the reaction medium, which is not needed for a plate assay. In this case, to obtain conjugates of MNP-antiFlu, it was necessary to carry out synthesis, while the plate immobilization was carried out by sorption during the night. Thus, both carriers can be used for heterogeneous assays, but the choice of a carrier depends on the tasks and equipment of specific laboratories.

Grant: The research was carried out with the financial support of the RFBR grant № 21-54-53007.

УДК 615.074:614.7 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-224-226

АНАЛИТИЧЕСКОЕ РЕШЕНИЕ ДЛЯ БЕЗОПАСНОГО ГРУДНОГО ВСКАРМЛИВАНИЯ. ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МАКРОЛИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ В МАТЕРИНСКОМ МОЛОКЕ

Буркин М.А.[1], **Гальвидис И.А.**[1], **Райсян А.**[2], **Шнайдер Р.**[2], **Еремин С.А.**[3]

[1] ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Малый Казенный пер. 5а., Москва, 105064 Россияа
[2] Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Berlin, 12489 Germany
[3] МГУ имени М. В. Ломоносова, ул. Ленинские Горы, 1, стр.3, Москва, 119234
e-mail: burma68@yandex.ru

При антибиотикотерапии женщин в период лактации кларитромицин (КЛА), рокситромицин (РОК), эритромицин (ЭРИ), азитромицин (АЗИ), диритромицин (ДИР) и олеандомицин (ОЛЕ) экскретируются в грудное молоко. Экспресс-тест на основе групп-специфичных антител для выявления этих аналитов в грудном молоке разработан как средство само/контроля безопасного вскармливания младенцев.

Ключевые слова: грудное вскармливание; материнское молоко; макролидные антибиотики, иммуноанализ; стрип-тест; групповая специфичность

Макролидные антибиотики - группа препаратов эффективных и широко применяемых для лечения

грам-положительных и грам-отрицательных инфекций, а также активных против внутриклеточных патогенов (микоплазм, хламидий, легионелл). Как и большинство лекарственных средств, при лечении кормящих матерей эти препараты способны проникать в грудное молоко и представлять опасность для здоровья младенцев. С целью обнаружения антибиотиков группы макролидов в грудном молоке был разработан групповой иммунохроматографический анализ. Для получения антител с групповой специфичностью основными эпитопами-мишенями были выбраны общие структурные элементы макролидов с 14- и 15-членным лактонным кольцом, десозамин и кладиноза. Конъюгат БСА с карбоксиметилоксим-КЛА, обеспечил презентацию этих эпитопов и в качестве иммуногена индуцировал образование антител с групповым распознаванием [1]. Полученные антитела, связанные с окрашенными латексными частицами, двигаясь в капилярном потоке по нитроцеллюлозной мембране, взаимодействовали с ЖЕЛ-кмоКЛА конъюгатом в тест-зоне и с антителами к кроличьему IgG в контрольной зоне. Ослабление интенсивности окраски или исчезновение полосы в тест-зоне свидетельствовало о присутствии любого из 6 макролидов в исследуемом образце. Нагрузка антител на латексных частицах и режим нанесения антигена в тест-зоне был оптимизирован и позволил в 100 раз улучшить предел визуальной детекции. При использовании стрип-сканера предел определения существенно снизился и составил 0.12, 0.15, 1.4, 2.1, 2.4 и 3.3 нг/мл для КЛА, РОКС, ЭРИ, ДИР, АЗИ и ОЛЕ. Из-за непостоянства состава грудного молока, как в процессе кормления, так и на протяжении всего периода лактации, для унифицирования образцов грудного молока и устранения матрикс-эффекта была предложена 20-мин пробоподготовка. При этом степень извлечения аналитов составила 71-110%. В результате визуальная выявляемость упомянутых шести макролидов могла осуществляться в диапазоне 10–1000 нг/мл, а при инструментальной обработке результатов соответственно - 4.0, 2.5, 30, 42, 42 и 180 нг/мл [2]. Таким образом, появление лекарственных препаратов макролидного ряда и их исчезновение из грудного молока в результате экскреции могут регистрироваться с помощью простого и быстрого иммунохроматографического теста и позволяют предотвратить нежелательную лекарственную нагрузку и обеспечить безопасное кормление младенца.

Литература

[1] Galvidis I., Lapa G., Burkin M. Group determination of 14-membered macrolide antibiotics and azithromycin using antibodies against common epitopes // Anal. Biochem. 2015. Vol. 468. P. 75–82. https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.09.009

[2] Raysyan A., Galvidis I., Schneider R., Eremin S, Burkin M. Development of a latex particles-based lateral flow immunoassay for group determination of macrolide antibiotics in breast milk // J Pharm Biomed Analysis. 2020. Vol. 189. 113450. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113450

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-224-226

ANALYTICAL SOLUTION FOR SAFE BREASTFEEDING. IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY OF MACROLIDE ANTIBIOTICS IN MOTHER'S MILK

Burkin M.A.[1], **Galvidis I.A.**[1], **Raysyan A.**[2], **Schneider R.J.**[2], **Eremin S.A.**[3]

[1] *I.Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Maliy Kazionniy per. 5a, Moscow, 105064, Russia;*
[2] *Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Berlin, 12489 Germany;*
[3] *Chemical Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gori 1, Moscow, 119234 Russia;*
e-mail: burma68@yandex.ru;

When antibiotics are given to nursing women, clarithromycin (CLA), roxithromycin (ROK), erythromycin (ERI), azithromycin (AZI), dirithromycin (DIR), and oleandomycin (OLE) are excreted in breast milk. A rapid group-specific antibody test for these analytes in breast milk has been developed as a self-monitoring tool for safe feeding in infants.

Keywords: breast-feeding; mother's milk; macrolide antibiotics, immunoassay; strip test; group specificity;

Macrolide antibiotics are a group of drugs that are effective and widely used for the treatment of gram-positive and gram-negative infections, as well as active against intracellular pathogens (mycoplasma, chlamydia, legionella).

Like most drugs, when treating nursing mothers, these drugs can enter into breast milk and pose a health risk to infants. In order to detect antibiotics of the macrolide group in breast milk, a group-specific immunochromatographic assay was developed. To generate antibodies with group specificity, common structural elements of macrolides with a 14- and 15-membered lactone ring, desosamine and cladinose were selected as the main target epitopes. The BSA conjugate with carboxymethyloxime-CLA provided the presentation of these epitopes and, as an immunogen, induced the antibodies with group recognition [1]. The resulting antibody was bound to colored latex particles. Moving in a capillary flow along the nitrocellulose membrane, they interacted with the GEL-cmoCLA conjugate in the test zone and with anti-rabbit IgG in the control zone. The weakening of the color intensity or the disappearance of the band in the test zone indicated the presence of any of the 6 macrolides in the test sample. The loading of antibodies on latex particles and the mode of applying the antigen in the test zone were optimized and made it possible to improve the visual detection limit by a factor of 100. When using a strip-scanner, the detection limit decreased significantly and was 0.12, 0.15, 1.4, 2.1, 2.4 and 3.3 ng/ml for CLA, ROX, ERI, DIR, AZI and OLE. Due to the variability of breast milk composition, both during feeding and throughout the entire lactation period, a 20-min sample preparation was proposed to unify breast milk samples and eliminate the matrix effect. In this case, the degree of extraction of analytes was 71-110%. As a result, the visual detection of the above six macrolides could be carried out in the range of 10–1000 ng/ml, and with instrumental processing of the results, respectively, 4.0, 2.5, 30, 42, 42, and 180 ng/ml [2]. Thus, the appearance of macrolides and their disappearance from breast milk as a result of excretion can be recorded using a simple and rapid immunochromatographic test and can prevent unwanted drug exposure and ensure safe feeding of infants.

References

[1] Galvidis I., Lapa G., Burkin M. Group determination of 14-membered macrolide antibiotics and azithromycin using antibodies against common epitopes // Anal. Biochem. 2015. Vol. 468. P. 75–82. https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.09.009

[2] Raysyan A., Galvidis I., Schneider R., Eremin S, Burkin M. Development of a latex particles-based lateral flow immunoassay for group determination of macrolide antibiotics in breast milk // J Pharm Biomed Analysis. 2020. Vol. 189. 113450. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113450

УДК 579.64 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-226-227

ИЗУЧЕНИЕ ВИРОМА ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОЛЛЕКЦИЙ ВИНОГРАДА

Виноградова С.В.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН;
Институт биоинженерии, Москва, Россия
117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября д. 7, корп.1
e-mail: svetlana.vinogradova@biengi.ac.ru

Виноградники России являются малоисследованным резервуаром генетического разнообразия вирусов. Применение методов метагеномики позволяет получить информацию о вироме растения и может быть использовано для установления этиологии нового заболевания.

Ключевые слова: виноград, вироме, вирусы винограда, ампелографические коллекции, генетические коллекции

Виноград поражается различными патогенами, в том числе вирусами. В настоящее время эффективных средств защиты для борьбы с вирусами в полевых условиях не существует. Поэтому освободить растения от вирусной инфекции невозможно, причем пораженные лозы становятся источником распространения патогенов. В связи с этим важным становится использование безвирусного посадочного материала при закладке виноградников и внедрение молекулярных методов для детекции вирусов на различных этапах его получения. Применение методов метагеномики, базирующихся на секвенировании нового поколения (NGS), при изучении этиологии заболеваний растений вывело детекцию фитопатогенов на новый уровень. С помощью NGS возможно получить информацию не просто о наличии конкретного вируса в растении, а о вироме, т.е. обо всех вирусах, находящихся в образце.

Виноградники России являются малоисследованным резервуаром генетического разнообразия вирусов. Отечественные сорта винограда, а также большая коллекция маточных растений, собранных со всего мира, являются источником новых видов вирусов. С практической точки зрения определение вирома растений с неописанной ранее симптоматикой может позволить выявить как новые, так и ранее описанные вирусы, но вызывающие другие симптомы на сортах отечественной селекции в условиях культивирования южной зоны России.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-907 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего» с использованием оборудования ЦКП «Биоинженерия» и ЭУИК U-73547.

UDK 579.64 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-226-227

VIROME OF GRAPEVINE GENETIC COLLECTIONS

Vinogradova S.V.

Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Institute of Bioengineering, Moscow, Russia
117312, Moscow, prospect 60-letia Oktyabrya, 7, bld. 1
e-mail: svetlana.vinogradova@biengi.ac.ru

Russian vineyards are an underexplored reservoir of viral genetic diversity. The use of metagenomics methods allows to obtain information about the virome of a plant and can be used to establish the etiology of a new disease.

Keywords: grapevine, virome, grapevine viruses, ampelographic collections, genetic collections

The grapevine is affected by various pathogens, including viruses. Currently, there are no effective measures for virus control in the field. Therefore it is impossible to get virus-free plants in vineyard, and the affected vines become a source of pathogens. So, using of virus-free planting material and its approval by molecular methods becomes very important. Metagenomics methods based on next generation sequencing (NGS) are take the detection of phytopathogens and studying the etiology of plant diseases to a new level. NGS allows getting information not only about the presence of a specific virus, but about the virome, i.e. about all viruses in the sample.

Russian vineyards are an underexplored reservoir of viral genetic diversity. Local grapevine varieties, as well as a large collection of mother plants from all over the world, can be a source of new virus species. The determination of virome of plants with unknown symptoms can reveal both new and previously described viruses, but causing other symptoms on local varieties under the climate of the southern of Russia.

The article was made with support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in accordance with agreement № 075-15-2020-907 date November 16, 2020 on providing a grant in the form of subsidies from the Federal budget of Russian Federation. The grant was provided for state support for the creation and development of a World-class Scientific Center "Agrotechnologies for the Future" using the scientific equipment of Core Research Facility of Center «Bioengineering» and experimental climate control facility U-73547.

УДК 632.3 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-227-229

ПРОБЛЕМЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КАРАНТИННЫХ ФИТОБАКТЕРИОЗОВ

Дренова Н.В.[1], **Джалилов Ф.С.**[2]

[1] *ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), Быково, Россия.*
[2] *ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва, Россия.*
140150, Московская обл., г. Раменское, р.п. Быково, ул. Пограничная, д. 32.
e-mail: drenova@mail.ru

Освещены современные проблемы и подходы к разработке методик исследования растительных образцов на выявление возбудителей карантинных бактериальных болезней растений в условиях аккредитованных лабораторий и в научных целях.

Ключевые слова: молекулярные методы, ПЦР, контаминация, выявление, идентификация, жизнеспособность.

Надежная диагностика карантинных вредных организмов (КВО) – необходимый элемент предотвращения их распространения на новые территории. Карантинные меры предполагают, с одной стороны, нулевую толерантность к содержанию возбудителя в продукции, а с другой, минимизацию ущерба экономической деятельности. В связи с этим, рутинные исследования обязаны обеспечивать высокую надежность выявления КВО при минимальных затратах времени и средств для оптимизации контрольно-надзорной нагрузки на предприятия. Многолетний опыт аккредитованных лабораторий Россельхознадзора выявил ряд общих проблем традиционных схем диагностики карантинных бактерий.

Так, в большинстве общепринятых Диагностических Стандартов ЕОКЗР серии PM7 [1] обязательным критерием установления положительного диагноза, являются традиционные в классической микробиологии изоляция и идентификация чистой культуры возбудителя. Однако на практике при анализе образцов с латентной инфекцией, в особенности, для медленно растущих бактерий, изоляция бывает неприемлемо продолжительна, а зачастую и невозможна. С развитием высокочувствительных экспресс-тестов стало возможным надежно выявлять патогены без изоляции, опираясь на положительные результаты 2-3 тестов, как это принято для некультивируемых карантинных микроорганизмов. Однако при таком подходе сохраняется дискуссия о жизнеспособности бактерий в партии, что имеет основополагающее значение для оценки рисков ее перемещения и использования. Кроме того, в этом случае значительно повышаются требования как к разработке комплекса тестов, так и к надежности их применения в лабораториях. Среди ключевых аспектов здесь следует учитывать характеристики антител, полимераз и других реактивов, а также обеспечение антиконтаминационных мер.

В современной практике международные диагностические протоколы обычно включают ряд отдельных тестов, разработанных научными коллективами разных стран и компаний, и, как правило, испытанных и принятых в авторском варианте, без попытки их унификации, приведения к близким значениям таких важных показателей, как аналитическая и диагностическая чувствительность. В этом случае при низкой зараженности и/или плохом состоянии образца результаты тестов, имеющих разные рабочие критерии, могут не совпадать, что приводит к затруднениям в интерпретации результатов лабораторного исследования. Поэтому, при разработке методик, необходимо модифицировать тесты и проводить их комплексные испытания на естественно или искусственно зараженном растительном материале, доводя рабочие критерии до максимально близких.

В противоположность необходимости исключения изоляции культуры возбудителя карантинного бактериоза из схемы его лабораторной диагностики, в научных целях бывает необходимо или желательно получить чистую культуру или подтвердить жизнеспособность возбудителя в образце растительной ткани, что как отмечено выше, может быть затруднительно и требует разработки специфических подходов. В настоящее время для этих целей рассматриваются методы изоляции на селективные среды [1, 2], иммуномагнитной сепарации [3], био-изоляция и био-ПЦР-РВ [1].

Литература

1. *Diagnostic Standards // Europ. and Mediterran. Plant Protection Organization: https://www.eppo.int/RESOURCES/eppo_standards/pm7_diagnostics (дата обращения 26.08.2021).*
2. *Ishimaru E.S., Klos E.J. New medium for detection of Erwinia amylovora and its use in epidemiological studies // Phytopathology. 1984. №74. P. 1342–1345.*
3. *de León L., Siverio F., Rodríguez A. Detection of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis in tomato seeds using immunomagnetic separation // Journal of Microbiological Methods. 2006. № 67.P. 141–149.*

UDC 632.3 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-227-229

PROBLEMS OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF THE CAUSAL AGENTS OF QUARANTINE PHYTOBACTERIOSIS

Drenova N.V.[1], **Dzhalilov F.S.**[2]

[1] *All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU "VNIIKR"), Bykovo, Russia.*
[2] *Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia.*
140150, Russia, Moscow region, Ramenskoye, Bykovo, Pogranichnaya str., 32.
e-mail: drenova@mail.ru

Current problems and approaches to the development of methodology for testing of plant samples for detection of quarantine bacterial plant diseases pathogens in conditions of accredited laboratories and for scientific purposes are highlighted.
Key words: molecular tests, quarantine PCR, contamination, detection, identification, viability.

Reliable diagnostics of quarantine pests (QP) is a necessary element to prevent their spread to new territories. Quarantine measures presuppose, on the one hand, zero tolerance to the content of the pathogen in plant products, and on the other, minimization of barriers to economic activity. In this connection, routine expertise is required to ensure high reliability of QP detection with minimal investment of time and resources to optimize the control and supervisory expenses of companies. Long-term experience of Rosselkhoznadzor accredited laboratories has revealed a number of common problems with traditional diagnostic schemes for quarantine bacteria.

Thus, in most of the common EPPO Diagnostic Standards of the PM7 series [1], the isolation and identification of a pure bacterial culture are required for establishing a positive diagnosis, which it's traditional in classical microbiology. However, in practice, when analyzing samples with latent infection, especially for slowly growing bacteria, isolation can be unacceptably long, and often impossible. Development of highly sensitive rapid tests allows to reliably detect pathogens without isolation, based on the positive results of 2-3 tests, as is accepted for unculturable quarantine microorganisms. However, this approach retains a discussion about the viability of bacteria in a lot, which is important for the movement and use risks assessment. In addition, in this case, the requirements both for the development of a set of tests and for the reliability of their use in laboratories are significantly increased. Key aspects to consider here are the characteristics of antibodies, polymerases and other reagents, as well as the ensuring of anti-contamination measures.

In current practice, international diagnostic protocols usually include a number of separate tests developed by research teams from different countries and companies. As a rule, they are accepted and validated in the author's version, without unification and bringing such important characteristics as analytical and diagnostic sensitivity to close values. In this case, when the low infection and / or poor condition of the sample, the results of tests with different performance criteria may not be the same, which leads to difficulties in the interpretation of laboratory results. Therefore, when developing diagnostic scheme, it is necessary to modify the tests and carry out their complex validation using naturally or artificially infected plant material for bringing the possibly closest characteristics.

In contrast to the need to exclude the isolation from the laboratory diagnostics scheme, for scientific purposes it may be necessary or desirable to obtain a bacterial pure culture or to confirm the viability of the pathogen in a plant tissue sample, which can be difficult and requires the development of specific approaches as noted above.

Currently, for these purposes, methods of isolation on selective media [1, 2], immunomagnetic separation [3], bio-isolation and bio-qPCR [1] are considered.

References

1. *Diagnostic Standards // Europ. and Mediterran. Plant Protection Organization: https://www.eppo.int/RESOURCES/eppo_standards/pm7_diagnostics (дата обращения 26.08.2021).*
2. *Ishimaru E.S., Klos E.J. New medium for detection of Erwinia amylovora and its use in epidemiological studies // Phytopathology. 1984. №74. P. 1342–1345.*
3. *de León L., Siverio F., Rodríguez A. Detection of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis in tomato seeds using immunomagnetic separation // Journal of Microbiological Methods. 2006. № 67.P. 141–149.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-229-231

ПОДХОДЫ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЭКСПРЕССНЫХ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ

Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Рассмотрены различные нанодисперсные маркеры и их сочетания для проведения иммунохроматогра-

фии с колориметрической и флуориметрической детекцией; охарактеризованы из возможности для снижения предела определения. Описано влияние состава конъюгатов антитело-наномаркер на аналитические параметры тест-систем.
Ключевые слова: иммуноанализ, иммунохроматография, наночастицы, иммобилизованные антитела, усиление аналитического сигнала

Обеспечение широкого мониторинга патогенов, в том числе фитопатогенов, требует разработки средств их экспрессного определения, в том числе во внелабораторных условиях. Эффективным подходом для такого тестирования является иммунохроматография, проведение которой позволяет за 10-15 минут без приборного обеспечения получить визуально оцениваемые результаты. Однако выявление с помощью иммунохроматографических тест-систем низких концентраций аналитов требует выбора оптимальных наночастиц, используемых в качестве маркеров и носителей, а также способов из комплексообразования с антителами, обеспечивающих максимальную аффинность получаемых препаратов. В докладе представлена структурно-функциональная характеристика комплексов наночастиц, отличающихся по размерам, форме, оптическим свойствам, с антителами.

Предложены флуориметрические методы контроля состава и антиген-связывающей способности антител в комплексах с наночастицами. Показана инактивация значительной части адсорбционно иммобилизуемых антител. Отмечено, что в «сэндвич»-иммунохроматографии поливалентных антигенов оптимальны режимы иммобилизации, приводящие к не более чем 50%-ному покрытию поверхности нанодисперсного носителя антителами. Определены концентрационные зависимости иммобилизации антител для сферических и несферических («наноцветы») наночастиц золота разного диаметра. Сопоставлены возможности фото- и флуориметрических нанодисперсных маркеров, исходя из достигаемых с их помощью пределов обнаружения в конкурентных и неконкурентных форматах иммуноанализа. Предложены варианты усиления оптического сигнала в иммунохроматографии, основанные на формировании за время проведения анализа агрегатов из нескольких типов функционализированных наночастиц. Установлены условия использования комплексов металлических наночастиц с антителами для окислительной трансформации хромогенных субстратов, обеспечиваемой благодаря каталитическим (нанозимным) свойствам наночастиц и позволяющей снизить минимальное количество выявляемого аналита. Охарактеризовано применение комплексов антител с магнитными частицами как средств для отделения аналитов от компонентов матрикса проб и их концентрирования с последующим иммунохроматографическим детектированием образующихся иммунных комплексов. Исходя из установленных закономерностей, разработаны тест-системы для выявления бактериальных, вирусных и грибных патогенов, поражающих различные сельскохозяйственные культуры. Показано снижение пределов обнаружения фитопатогенов до 100 раз благодаря применению предложенных подходов.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-907 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-229-231

APPROACHES FOR IMPROVING SENSITIVITY OF RAPID IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS

Dzantiev B.B.

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Acad. Sci., Moscow, Russia
119071 Moscow, Leninsky prospect 33
e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Various nanodispersed markers and their combinations for immunochromatography with colorimetric and fluorimetric detection are considered and their opportunities for lowering the detection limit are characterized. The influence of the composition of antibody-nanomarker conjugates on analytical parameters of the test systems is described.

Keywords: immunoassay, immunochromatography, nanoparticles, immobilized antibodies, amplification of analytical signal

Ensuring wide monitoring of pathogens, including phytopathogens, requires the development of tools for their rapid determination, including ones for the use in out-of-laboratory conditions. An effective approach for such testing is immunochromatography, which makes it possible to obtain visually assessed results in 10-15 minutes without instrumentation. However, detection of low concentrations of analytes using immunochromatographic test systems requires the finding optimal nanoparticles to be used as markers and carriers, as well as methods of their complexation with antibodies that provide the maximum affinity of the preparations obtained. The report presents structural and functional characterization of the complexes between nanoparticles differing in size, shape, and optical properties and antibodies.

Fluorometric methods for controlling the composition and antigen-binding capacity of antibodies in complexes with nanoparticles were proposed. The inactivation of a significant part of the adsorptively immobilized antibodies was shown. It was noted that in "sandwich" immunochromatography of polyvalent antigens, the optimal immobilization modes lead to no more than 50% coverage of the surface of the nanodispersed carrier with antibodies. The concentration dependences of antibodies immobilization for spherical and non-spherical ("nanoflowers") gold nanoparticles with different diameters were described. The capabilities of photo- and fluorimetric nanodispersed markers were compared in terms of the reached detection limits for competitive and non-competitive immunoassays. Variants of optical signal amplification in immunochromatography based on the formation of aggregates between several types of functionalized nanoparticles during the analysis were proposed. The conditions for the use of complexes between metal nanoparticles and antibodies for oxidative transformation of chromogenic substrates, which was provided due to catalytic (nanozyme) properties of the nanoparticles and allows lowering the minimum amount of detected analyte, were established.

The use of antibodies complexes with magnetic particles as tools for separation of analytes from matrix components of samples and concentration of the analytes with subsequent immunochromatographic detection of the formed immune complexes was characterized. Basing on the established regularities, test systems have been developed to detect bacterial, viral and fungal pathogens infecting various agricultural crops. It has been shown that the detection limits of the phytopathogens were reduced by up to 100 times due to the application of the proposed approaches.

The study was made with support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in accordance with agreement N 075-15-2020-907 date November 16, 2020 on providing a grant in the form of subsidies from the Federal budget of Russian Federation. The grant was provided for state support for the creation and development of a World-class Scientific Center "Agrotechnologies for the Future".

УДК 543.9+543.552 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-231-232

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЕ СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ИНСЕКТИЦИДОВ

Шамагсумова Р.В., Евтюгин Г.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия
420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18
e-mail: gevtugyn@mail.ru

Рассмотрены операционные и аналитические характеристики электрохимических биосенсоров на основе ацетилхолинэстеразы для определения ингибиторов фермента. Показано, что использование смесей углеродных наноматериалов повышает чувствительность определения по сравнению с однокомпонентными покрытиями. Работоспособность биосенсоров апробированана примере определения обратимых ингибиторов в урине и сыворотке крови.

Ключевые слова: электрохимические сенсоры, ферментные сенсоры, восстановленный оксид графена, углеродная чернь, углеродные нанотрубки, определение ингибиторов

Рассмотрены условия иммобилизации ацетилхолинэстеразы на стеклоуглеродных электродах, модифицированных двухкомпонентными смесями углеродной черни, восстановленного оксида графена и углеродных нанотрубок, полученных из суспензий в ацетоне, хлороформе и тетрагидрофуране. Установлена возможность варьирования чувствительности определения ингибиторов, меняя состав покрытия. Показано, что суспензии из двух наноматериалов имеют преимущества над однокомпонентными смесями за счет увеличения удельной площади поверхности электрода и проявлении синергетического эффекта при электрокаталитическом окислении тиохолина, продукта ферментативной реакции. Работоспособность биосенсоров апробированана примере определения обратимых ингибиторов в урине и сыворотке крови.

Исследования проводили при поддержке РФФИ (грант 20-03-00207).

UDC 543.9+543.552 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-231-232

ELECTROCHEMICAL ACETYLCHOLINESTERASE SENSORS BASED ON CARBON NANOMAERIALS FOR THE DETERMINATION OF DRUGS AND INSECTICIDES

Shamagsumova R.V., Evtugyn G.A.

Kazan (Volga-region) federal university, Kazan, Russia
420008, Kazan, Kremlevskaya Street, 18
e-mail: gevtugyn@mail.ru

Operational and analytical characteristics of electrochemical biosensors based on acetylcholinesterase have been considered for the determination of enzyme inhibitors. As was shown, application of the mixtures of carbon nanomaterials increases sensitivity of determination over that of single component coatings. Biosensors were tested on determination of reversible inhibitors in urea and blood serum.

Key words: electrochemical sensors, enzyme sensors, reduced graphene oxide, carbon black, carbon nanotubes, inhibitor determination

Conditions for immobilization of acetylcholinesterase on glassy carbon electrode modified with binary mixtures of carbon black, reduced graphene oxide and carbon nanotubes obtained in acetone, chloroform and tetrahydrofuran have been investigated. As was found, sensitivity of the inhibitor determination can be varied by changing the coating content. Suspensions of two nanomaterials showed advantage over the single component coatings due to higher specific surface of the electrode and synergetic effect at electrocatalytic oxidation of thiocholine (product of enzymatic reaction). Applicability of biosensors was tested on the example of determination of reversible inhibitors in urea and blood serum.

Financial support of Russian Foundation for Basic Research (RFBR) is gratefully acknowledged (grant No 20-03-00207).

УДК 57.083.3; 535.518; 547.588 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-232-234

РАЗРАБОТКА ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА ФТАЛАТОВ: СРАВНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ АНТИТЕЛ И ТРЕЙСЕРОВ

Еремин С.А.[1,2], Шанин И.А.[1], Каримова М.Р.[2], Мухаметова Л.И.[2]

[1] Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский проспект, 33
[2] Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия
119991, Москва, Ленинские горы, 1
e-mail: eremin_sergei@hotmail.com

Получены реагенты для поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (**ПФИА**) фталатов: конъюгаты фталатов с белками, поликлональные антитела, трейсеры – антигены, меченные производными флуоресцеина. На примере дибутилфталата (**ДБФ**) с использованием портативного детектора Sentry-200 разработана методика ПФИА, позволяющая за 5 мин определяют ДБФ в пробах воды в концентрациях до 1 мкг/мл.

Ключевые слова: фталаты, дибутилфталат, антитела, поляризационный флуоресцентый иммуноанализ

Для экологического мониторинга питьевой, природной и сточной воды необходимы простые и быстрые методы количественного определения загрязнителей. Используемая для этой цели жидкостная и газовая хроматография не позволяет проводить массовый скрининг. Простую, быструю и высокопроизводительную детекцию низкомолекулярных органических веществ обеспечивают иммунохимические методы анализа, прежде всего поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА). ПФИА основан на конкуренции определяемого вещества и вещества, меченного флуорофором (трейсера), за центры связывания специфических антител. Последующее облучение реакционной смеси плоскополяризованным светом и регистрация поляризации флуоресценции позволяют определить соотношение свободного и связанного с антителами трейсера, отражающее содержание определяемого вещества в пробе. Метод ПФИА является гомогенным и одностадийным: после добавления к пробе двух реагентов и нескольких минут инкубации регистрируется поляризация флуоресценции.

Данная работа посвящена получению специфических антител и разработке ПФИА для определения пластификаторов – дибутилфталата (ДБФ), монобутилфталата, диэтилфталата и других фталатов, попадающих в воду из пластика. Синтезированы конъюгаты производных фталатов с белками и с их использованием получены поликлональные кроличьи антитела. Получены трейсеры с различной длиной и положением $-(CH_2)n-$ ножки между фталатом и флуоресцеином. Рассмотрены различные сочетания реагентов для конкурентного взаимодействия и оптимизированы условия проведения ПФИА. Поляризация флуоресценции регистрируется с помощью портативного детектора Sentry-200. Общее время анализа – не более 5 минут. Предварительно достигнутый уровень минимальной определяемой концентрации для ДБФ составляет 1 мкг/мл, тогда как предельно допустимая концентрация ДБФ в воде равняется 0.3 мкг/мл. При тестировании 32 проб воды с водоочистных сооружений Подмосковья в двух пробах детектировался ДБФ на уровне 1.8 и 2,1 мкг/мл.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 21-14-00306).

57.083.3; 535.518; 547.588 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-232-234

DEVELOPMENT OF FLUORESCENCE POLARIZATION IMMUNOASSAY OF PHTHALATES: COMPARISON OF DIFFERENT DERIVATIVES IN OBTAINING ANTIBODIES AND TRACERS

Eremin S.A.[1,2], **Shanin I.A.**[1], **Karimova M.R.**[2], **Mukhametova L.I.**[2]

[1] *Research Center of Biotechnology Russian Academy of Science, A.N.Bach Institute of Biochemistry, Moscow*
[2] *M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Moscow*
e-mail: eremin_sergei@hotmail.com

Reagents for fluorescence polarization immunoassay (FPIA) of phthalates have been obtained: phthalate-protein conjugates, polyclonal antibodies, tracers - antigens labeled with fluorescein derivatives. By the example of dibutyl phthalate (DBP) with the use of a portable detector Sentry-200, the FPIA method was developed, which makes it possible to determine DBP in water samples in concentrations 1 μg / ml in 5 min.

Key words: phthalates, dibutyl phthalate, antibodies, fluorescence polarization immunoassay

Environmental monitoring of drinking water, natural water and waste water requires simple and fast methods to quantify pollutants. Liquid and gas chromatography used for this purpose does not allow mass screening. Simple, fast and high-throughput detection of low-molecular-weight organic substances is provided by immunochemical methods of analysis, primarily fluorescence polarization immunoassay (FPIA). FPIA is based on the competition

between an analyte and a substance labeled with a fluorophore (tracer) for binding sites of specific antibodies. Subsequent irradiation of the reaction mixture with plane-polarized light and registration of fluorescence polarization make it possible to determine the ratio of free and antibody-bound tracer, reflecting the content of the analyte in the sample. The FPIA method is homogeneous and one-step: after adding two reagents to the sample and a few minutes of incubation, the fluorescence polarization is recorded. This work is devoted to the production of specific antibodies and the development of PPIA for the determination of plasticizers - dibutyl phthalate (DBP), monobutyl phthalate, diethyl phthalate and other phthalates that get into water from plastic. Conjugates of phthalate derivatives with proteins were synthesized and polyclonal rabbit antibodies were obtained using them. Tracers with different lengths and positions - (CH_2) n-legs between phthalate and fluorescein were obtained. Various combinations of reagents for competitive interaction are considered and the conditions for conducting FPIA are optimized. Fluorescence polarization is recorded using a portable Sentry-200 detector. The total analysis time is no more than 5 minutes. The previously achieved level of the minimum detectable concentration for DBP is 1 μg / ml, while the maximum permissible concentration of DBP in water is 0.3 μg / ml. When testing 32 samples of water from wastewater treatment plants in the Moscow Region, DBP was detected in two samples at a level of 1.8 and 2.1 μg / ml.

The research was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant 21-14-00306).

УДК 57.083.3+577.182.22 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-234-236

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ПЕНИЦИЛЛИНОВ В МОЛОЧНОЙ И МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ

Куприенко О.С., Зильберман А.И., Вашкевич И.И., Свиридов О.В.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь,
220141, г. Минск, ул. Академика В.Ф.Купревича, д.5, корп.2, e-mail: kuprienko@iboch.by

Получены специфические иммунореагенты и разработана методика прямого иммуноферментного анализа с очень высокой чувствительностью к пенициллинам в стандартных растворах (0,06 нг/мл), а также в образцах молока (0,3 мкг/кг) и мяса (2,4 мкг/кг).

Ключевые слова: пенициллины, иммуноферментный анализ, биобезопасность пищевых продуктов

Пенициллины, относящиеся к бета-лактамным антибиотикам, являются эффективными и широко используемыми лекарственными средствами. В состав ветеринарных препаратов чаще всего включают пенициллины амоксициллин, пенициллин G, ампициллин и клоксациллин. В странах-членах Таможенного союза и Евросоюза установлены максимальные допустимые уровни (МДУ) содержания остатков этих бета-лактамных антибиотиков в продуктах питания животного происхождения. Величина МДУ для амоксициллина, пенициллина G и ампициллина в молоке составляет 4 мкг/кг, в мясе – 50 мкг/кг. Для клоксациллина величина МДУ в 6-7,5 раз больше.

С использованием полученных и охарактеризованных иммунореагентов нами разработана тест-система прямого иммуноферментного анализа (ИФА) пенициллинов. В качестве иммуносорбента использован планшет с иммунохимически иммобилизованными поликлональными антителами, специфичными в отношении пенициллинов. Перекрестная реактивность антител к амоксициллину составляет 100%, пенициллину G – 35 %, ампициллину – 71%, клоксациллину – 15 %, ампициллину с разрушенным бета-лактамным кольцом – менее 0,05 %. Калибровочная проба, содержащая амоксициллин, представляет собой лиофилизованный препарат, что обеспечивает стабильность неустойчивого в растворенном виде бета-лактамного антибиотика. Ферментный конъюгат, входящий в состав тест-системы, синтезирован с использованием производного амоксициллина, которое через кросс-линкер, включающий ароматический фрагмент терефталевой кислоты, прикреплен к пероксидазе из корней хрена. Такой конъюгат в виде 100-кратного концентрата в условиях ускоренного старения оказался более стабильным по сравнению с аналогичным производным ампициллина. Иммунохимическая реакция в ИФА проводится в течение 1 ч при температуре 4–8 оС для замедления деградации бета-лактамного кольца в ходе анализа. Диапазон градуировочного графика ИФА – от 0,06 до 1,28 нг/мл.

Подготовка проб молока для анализа включает стадии обезжиривания (при необходимости) и последующего разведения в 5 раз специальным буфером, входящим в состав тест-системы. Для извлечения

пенициллинов из образцов мяса используется раствор на основе буфера Мак-Илвейна с pH 6,0. Полученный экстракт затем разводят буфером для разбавления проб таким образом, что суммарный фактор разведения образцов в результате пробоподготовки равняется 40. Нижний предел количественного определения (ПКО) пенициллинов в молоке составляет 0,3 мкг/кг, в мясе – 2,4 мкг/кг.

Проведен тест на открытие тест-системой амоксициллина в пробах молока (сухого обезжиренного после восстановления, стерилизованного и пастеризованного с содержанием жира 3,2 %) и мышечной ткани (свинина, мясо кур) в концентрациях близких и существенно меньших МДУ. Открытие амоксициллина в молоке на трех уровнях контаминации составило в среднем от 105 до 114 %, в мясе – от 84 до 90 % (таблица).

Таблица – Результаты определения содержания амоксициллина в молоке и мясе

Образец	Амоксициллин, мкг/кг		Открытие, %
	Внесено	найдено	
Молоко	0	менее ПКО	–
	0,50	0,60	114±8
	1,60	1,80	112±5
	5,00	5,20	105±5
Мясо	0	менее ПКО	–
	4,0	3,6	90±5
	12,8	11,1	86±8
	40,0	33,5	84±15

UDC 57.083.3+577.182.22 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-234-236

HIGHLY SENSITIVE IMMUNOASSAY OF PENICILLINS IN DAIRY AND MEAT PRODUCTS

Kuprienko O.S., Zilberman A.I., Vashkevich I.I., Sviridov O.V.

Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
220141, Minsk, Kuprevich Str., 5/2
e-mail: kuprienko@iboch.by

Specific immunoreagents have been obtained and a direct enzyme-linked immunosorbent assay with a very high sensitivity to penicillins in standard solutions (0.06 ng/ml) as well as in the samples of milk (0.3 μg/kg) and meat (2.4 μg/kg) has been developed.

Key words: penicillins, enzyme-linked immunosorbent assay, food biosafety

Beta-lactam antibiotics penicillins are effective and widely used drugs. The veterinary formulations most often include such penicillins as amoxicillin, penicillin G, ampicillin and cloxacillin. The maximum permissible residue levels (MRL) of these beta-lactam antibiotics in food of animal origin have been established in the countries of the Customs Union and in the European Union. The MRL for amoxicillin, penicillin G and ampicillin is 4 μg/kg in milk and 50 μg/kg in meat. For cloxacillin, the MRL is 6-7.5 times higher.

Using the prepared and characterized immunoreagents, we have developed a test-system for direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of penicillins. The polyclonal antibodies against penicillins were immobilized on the well surface of polystyrene microplates. The cross-reactivity of the antibodies to amoxicillin is 100 %, to penicillin G – 35 %, ampicillin – 71 %, cloxacillin – 15 %, ampicillin with a broken beta-lactam ring – less than 0.05 %. The standard of amoxicillin is in a lyophilized form to ensure the stability of the antibiotic. The enzyme conjugate as a component of the test-system was synthesized using an amoxicillin derivative coupled to horseradish peroxidase through a cross-linker containing the aromatic fragment of terephthalic acid. The amoxicillin-peroxidase conjugate in the form of a 100-fold concentrate was more stable under conditions of accelerated aging than a similar ampicillin derivative. The immunochemical reaction in ELISA is carried out for 1 h at a temperature in the range of 4–8 °C to slow down the degradation of the beta-lactam ring during the analysis. The ELISA calibration plot has a range from 0.06 to 1.28 ng/ml.

The preparation of milk samples for analysis includes the stages of defatting (if necessary) and subsequent 5-fold dilution with a special buffer comprised in the test system. For the extraction of penicillins from meat samples, a solution based on McIlwain's buffer with pH 6.0 is used. The resulting extract is then diluted with a sample dilution buffer so that the total dilution factor of the meat samples is 40. The lower limit of quantification (LOQ) of penicillins is 0.3 µg/kg in milk and 2.4 µg/kg in meat. Using the test-system, the recovery of amoxicillin from milk samples (dry skim after reconstitution, sterilized and pasteurized with a fat content of 3.2%) and muscle tissue (pork, chicken meat) in concentrations close and significantly lower than the MRL was studied. The recovery of amoxicillin at three levels of contamination averaged from 105 to 114 % in milk and from 84 to 90 % in meat (table).

Table – Results of amoxicillin determination in milk and meat

Sample	Amoxicillin, µg/kg		Recovery, %
	added	found	
Milk	0	< LOQ	–
	0,50	0,60	114±8
	1,60	1,80	112±5
	5,00	5,20	105±5
Meat	0	< LOQ	–
	4,0	3,6	90±5
	12,8	11,1	86±8
	40,0	33,5	84±15

УДК: 544.653.2; 543.645.9 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-236-238

ДЕЗОКСИУРИДИНТРИФОСФАТЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ АРОМАТИЧЕСКИМИ ГРУППАМИ ТИРОЗИНА, ДЛЯ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ РЕКОМБИНАЗНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК

Г.Р. Кутдусова[1], Е.В. Супрун[2]

[1] *ФГБОУВО Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, kutdusovagulnaz@yandex.ru, +79997193650*
[2] *ФГБНУ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Россия, 119121, Москва, Погодинская, 10, стр. 8, lenasuprun@mail.ru, +74992465820*

Протестирован набор дезоксиуридинтрифосфатов, модифицированных ароматическими группами тирозина или триптофана, в качестве субстратов для изотермической рекомбиназной полимеразной амплификации и носителей электроактивных «меток» для электрохимического определения двунитевых ДНК ампликонов.

Ключевые слова: нуклеиновая кислота, модифицированный нуклеотид, тирозин, рекомбиназная полимеразная амплификация

Нуклеиновые кислоты, несущие генетическую информацию и являющиеся неотъемлемой частью всех живых организмов и вирусов, представляют интерес в качестве биомаркеров различных заболеваний и загрязнения окружающей среды. В сочетании с биохимическими методами амплификации, прямое электрохимическое окисление ДНК может стать надежным способом количественного анализа биообразцов *in situ*. Целью настоящей работы стало объединение изотермической амплификации ДНК с электрохимическим анализом полученных двунитевых ДНК (днДНК) ампликонов путем введения в ферментативную реакцию электроактивных «меченых» производных 2'-дезоксиуридин-5'-трифосфата (дУТФ). Электрохимическое поведение ряда дУТФ, модифицированных ароматическими группами тирозина (Тир) или триптофана (Трп), было исследовано методом квадратно-волновой вольтамперометрии на печатных графитовых электродах.

Параллельно синтезированные производные дУТФ были проверены в качестве субстратов полимеразы в рекомбиназной полимеразной амплификации (РПА) – одного из наиболее широко используемых в биомедицине и сельском хозяйстве видов изотермической амплификации ДНК [1]. РПА не требует какого-либо специального оборудования и проводится при 37–41 оС или при температуре окружающей среды простым смешением ингредиентов [1]. Производные дУТФ продемонстрировали пики окисления при потенциалах 0.50–0.65 В, аналогично свободным Тир или Трп. При включении электроактивной «метки» в ампликоны днДНК длиной около 300 и 200 п. о., среди пяти протестированных производных только два нуклеотида с ароматическими группами Тир, а именно 5-аминоаллил-дУТФ, модифицированный 4-гидроксифенилуксусной кислотой или 4-гидроксифенилакриловой кислотой, показали хорошую совместимость с РПА. Вероятно, это связано со сравнительно небольшим размером остатка Тир. Модифицированные днДНК, полученные с помощью РПА, были определены в микромолярных концентрациях через окисление электроактивной «метки», в то время как сигналы окисления для обычной днДНК получены не были. Ранее нами было показано, что образование двойной спирали затрудняет прямое электрохимическое окисление днДНК за счет остатков нуклеиновых оснований [2]. Ранее все производные дУТФ, использованные в работе, показали хорошую совместимость с классическим методом ПЦР [3].

Разработанные производные дУТФ с остатками Тир представляются перспективными субстратами рекомбиназы для дальнейшей разработки электрохимических систем анализа in situ для применения в медицине, экологии и сельском хозяйстве.

Финансирование: Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект №19-14-00247).

Литература

1. *Li J. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification / J. Li, J. Macdonald, F. von Stetten // Analyst. – 2018. – V. 144. – P. 31–67.*
2. *Suprun E.V. Towards deeper understanding of DNA electrochemical oxidation on carbon electrodes / E.V. Suprun, G.R. Kutdusova, S.A. Khmeleva, S.P. Radko // Electrochem. Commun. – 2021. – V. 124. – № 106947.*
3. *Suprun E.V. Deoxyuridine triphosphates modified with tyrosine or tryptophan aromatic groups for direct electrochemical detection of double-stranded DNA / E.V. Suprun, S.A. Khmeleva, G.R. Kutdusova, I.F. Duskaev, V.E. Kuznetsova, S.A. Lapa, A.V. Chudinov, S.P. Radko // Electrochim. Acta. – 2020. – V. 362. – № 137105.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-236-238

DEOXYURIDINE TRIPHOSPHATES MODIFIED WITH AROMATIC TYROSINE GROUPS FOR ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION PRODUCTS OF DNA

G.Kutdusova[1], **E.Suprun**[2]

[1] *M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, Russia, 119991, Moscow, Lenin Hills, 1*
[2] *Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia, Russia, 119121, Moscow, Pogodinskaya, 10/8*

Deoxyuridine triphosphates modified with tyrosine or tryptophan aromatic groups were tested as electroactive 'labels' for the electrochemical detection of double-stranded DNA amplicons obtained by recombinase polymerase amplification.

Key words: nucleic acid, modified nucleotide, oxidation, tyrosine, recombinase polymerase amplification

Nucleic acids, which carry genetic information and are an integral part of all living organisms and viruses, are of interest as biomarkers of various diseases and environmental pollution. In combination with biochemical amplification methods, direct electrochemical oxidation of DNA can become a reliable way of quantitative detection of biological samples *in situ*. The aim of this work was to combine isothermal DNA amplification with electrochemical analysis of the obtained double-stranded DNA (dsDNA) amplicons by introducing electroactive 'labeled' derivatives of 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate (dUTP) into the enzymatic reaction. The electrochemical behavior of a set of dUTP derivatives modified by aromatic groups of tyrosine (Tyr) or tryptophan (Trp) was studied

by square-wave voltammetry on carbon screen printed electrodes. In parallel, the synthesized derivatives of dUTP were tested as substrates of polymerase in recombinase polymerase amplification (RPA), one of the most widely used types of isothermal DNA amplification in biomedicine and agriculture [1]. RPA does not require any special equipment and is carried out at 37–41 oC or at ambient temperature by simply mixing the ingredients [1]. The dUTP derivatives showed oxidation peaks at potentials of 0.50–0.65 V, similar to free Tyr or Trp. When the electroactive 'label' was included in dsDNA amplicons with a length of about 300 and 200 b. p., among the five tested derivatives, only two nucleotides with aromatic groups of Tyr, namely 5-aminoallyl-dUTP modified with 4-hydroxyphenylacetic acid or 4-hydroxyphenylacrylic acid, showed good compatibility with RPA. This is probably due to the relatively small size of the Tyr residue. Modified dsDNA obtained using RPA were determined in micromolar concentrations via the oxidation of an electroactive 'label', while no oxidation signals were obtained for control dsDNA. We have previously shown that the formation of a double helix hinders the direct electrochemical oxidation of dsDNA due to the residues of nucleic bases [2]. Previously, all the derivatives of dUTP used in the work showed good compatibility with the classical PCR method [3].

The developed derivatives of dUTP modified with Tyr residues are promising recombinase substrates for the further development of electrochemical in situ analytical systems for use in medicine, ecology and agriculture.

Grant: This work was financially supported by the Russian Science Foundation, grant 19-14-00247.

References

1. *Li J. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification / J. Li, J. Macdonald, F. von Stetten // Analyst. – 2018. – V. 144. – P. 31–67.*
2. *Suprun E.V. Towards deeper understanding of DNA electrochemical oxidation on carbon electrodes / E.V. Suprun, G.R. Kutdusova, S.A. Khmeleva, S.P. Radko // Electrochem. Commun. – 2021. – V. 124. – № 106947.*
3. *Suprun E.V. Deoxyuridine triphosphates modified with tyrosine or tryptophan aromatic groups for direct electrochemical detection of double-stranded DNA / E.V. Suprun, S.A. Khmeleva, G.R. Kutdusova, I.F. Duskaev, V.E. Kuznetsova, S.A. Lapa, A.V. Chudinov, S.P. Radko // Electrochim. Acta. – 2020. – V. 362. – № 137105.*

УДК 537.624.9 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-238-240

БИОСЕНСОРИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ДИАГНОСТИКА НА БАЗЕ УЛЬТРАЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ОПТИЧЕСКИХ И МАГНИТНЫХ МЕТОДОВ ИЗМЕРЕНИЙ

Никитин П.И.[1], **Орлов А.В.**[1,2], **Брагина В.А.**[1], **Гутенева Н.В.**[1], **Никитин М.П.**[2], **Горшков Б.Г.**[1]

[1] *Институт общей физики им. А.М.Прохорова РАН, Москва, Россия.*
119991, г. Москва, ул. Вавилова 38, E-mail: nikitin@kapella.gpi.ru
[2] *Московский физико-технический институт.*

Разработаны высокочувствительные методы оптических и магнитных измерений, которые протестированы для аналитических применений, медицинской диагностики, контроля безопасности продуктов питания и т. д. Достигнуты уникальные для экспрессных анализов пределы обнаружения: ДНК - 6×10^{-19} моль (без амплификации), гаптенов - 16 фг/мл, белковых биомаркеров - 4 пг/мл.

Ключевые слова: низкокогерентная интерферометрия, безмаркерные биосенсоры, наночастицы, золото, магнетит, нелинейное перемагничивание, аутоантитела, биологически активные вещества.

Разработан многопараметрический безметочный биосенсор для in vitro диагностики, основанный на применении спектрально-корреляционной интерферометрии и обработке изображения со стеклянного сенсорного микрочипа, имеющего доступную цену для одноразового использования в медицинских применениях. Биосенсор успешно протестирован для обнаружения различных биомолекул, для исследования антител пациентов, перенесших заболевание Covid-19 или вакцинацию. С этой целью применялись ранее разработанные подходы для диагностики аутоиммунных заболеваний, основанные на измерении концентрации и кинетических параметров аутоантител, отражающих их активность по отношению к собственным тканям организма [1]. Кроме того, впервые предложены новые критерии диагностики аутоиммунных заболеваний, основанные на измерениях концентрации и количественной оценке агрессивности

аутоантител [1]. Для детектирования низкомолекулярных соединений, например охратоксина А, успешно применялись модифицированные интерферометрические регистраторы в сочетании с сенсорными чипами, покрытыми графеновым слоем, функционализированным аптамерами [2]. Предложен новый формат измерения концентрации малых молекул, в том числе хлорамфеникола в молоке с помощью динамического светорассеяния [3].

Разработан новый скоростной метод для точной характеризации биоконъюгатов на основе наночастиц, а также определения кинетических свойств их связывания с целевыми молекулами. Работа метода продемонстрирована путем детектирования белковых энтеротоксинов (стафилококковый энтеротоксин В) и биомаркеров кардиологических заболеваний (кардиотропонин I) [4].

Кроме того, синтезированные наночастицы, конъюгированные с биораспознающими молекулами использовались для разработки быстрых форматов ДНК- [5] и иммуноанализов [6, 7]. В частности, разработан новый ультрачувствительный способ прямого (без амплификации или усиления реакции) измерения концентрации молекул РНК/ДНК на основе комбинации наночастиц золота и одноцепочечных молекул ДНК. Достигнута рекордная чувствительность вплоть до концентрации ДНК 30 фМ в чрезвычайно малом объёме 20 мкл и быстром (15 мин) простом в выполнении иммунохроматографическом анализе, который можно проводить даже в полевых условиях [5]. Достигнутый предел обнаружения находится на уровне 3×10^5 молекул ДНК в капле крови, что перспективно для разработки новых средств диагностики заболеваний.

Литература

1. *Orlov A.V. et al. Multiplex label-free biosensor for detection of autoantibodies in human serum: Tool for new kinetics-based diagnostics of autoimmune diseases // Biosensors and Bioelectronics. 2020. Vol. 159. P. 112187.*
2. *Nekrasov N. et al. Spectral-Phase Interferometry Detection of Ochratoxin A via Aptamer-Functionalized Graphene Coated Glass //Nanomaterials. 2021. Vol. 11, P. 226.*
3. *Levin A.D. et al. Dynamic light scattering biosensing based on analyte-induced inhibition of nanoparticle aggregation // Anal. Bioanal. Chem. 2020. Vol. 412, P. 3423–3431.*
4. *Cherkasov V.R. et al. Nanoparticle Beacons: Supersensitive Smart Materials with On/Off-Switchable Affinity to Biomedical Targets // ACS Nano. 2020. Vol. 14, P. 1792–1803.*
5. *Pushkarev A.V. et al. Rapid and Easy-to-Use Method for Accurate Characterization of Target Binding and Kinetics of Magnetic Particle Bioconjugates for Biosensing // Sensors. 2021. Vol. 21, P. 2802.*
6. *Znoyko S.L. et al. Nanomagnetic lateral flow assay for high-precision quantification of diagnostically relevant concentrations of serum TSH // Talanta. 2020. Vol. 216. P. 120961.*
7. *Bragina V.A. et al. Nanobiosensing based on optically selected antibodies and superparamagnetic labels for rapid and highly sensitive quantification of polyvalent hepatitis B surface antigen // Anal. Methods. 2021. Vol. 13, P. 2424–2433.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-238-240

BIOSENSING AND MEDICAL DIAGNOSTICS BASED ON ULTRA SENSITIVE OPTICAL AND MAGNETIC MEASUREMENTS

Nikitin P.I.[1], **Orlov A.V.**[1,2], **Bragina V.A.**[1], **Gyteneva N.V.**[1], **Nikitin M.P.**[2], **Gorshkov B.G.**[1]

[1] *Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*
38 Vavilova St., Moscow 119991, Russia, E-mail: nikitin@kapella.gpi.ru
[2] *Moscow Institute of Physics and Technology.*

Highly sensitive methods of optical and magnetic measurements have been developed and tested for analytical applications, medical diagnostics, food safety control, etc. The achieved detection limits are unique for express assays: DNA - 6×10^{-19} mol (without amplification), haptens - 16 fg/ml, protein biomarkers - 4 pg/ml.

Keywords: low-coherent interferometry, label-free biosensors, nanoparticles, gold, magnetite, non-linear remagnetization, autoantibodies, biologically active substances.

A multiplex label-free biosensor has been developed for in vitro diagnostics based on the spectral-correlation

interferometry and image processing of a microarray glass sensor chip, affordable to be single-used in medical applications. The biosensor was successfully tested for detection of various biomolecules, investigation of antibodies of the patients recovered from or vaccinated against COVID-19 disease. For that purpose, we employed the earlier developed approaches to diagnostics of autoimmune disorders based on measuring the concentration and kinetic parameters of autoantibodies, which reflect their activity against own tissues of the organism [1]. New criteria in diagnostics of autoimmune diseases have been proposed for the first time based on measurements of concentration and quantitative evaluation of autoantibody aggressiveness [1]. The modified interferometric instruments combined with the sensor chips coated with a graphene layer functionalized with aptamers have been successfully used for detection of low molecular weight compounds, e.g., Ochratoxin A [2]. A new format has been proposed for measuring the concentration of small molecules, including chloramphenicol in milk, using dynamic light scattering [3].

A novel rapid method has been developed for accurate characterization of bioconjugates based on nanoparticles and determination of kinetic properties of their binding with target molecules. The method performance has been demonstrated by detection of protein enterotoxins (staphylococcal enterotoxin B) and biomarkers of cardiac diseases (cardiac troponin I) [4].

The synthesized nanoparticles conjugated with biorecognition molecules have been also used for development of rapid formats of DNA- [5] and immunoassays [6,7]. In particular, a new ultrasensitive technique has been developed for direct (with no amplification) measuring the concentration of RNA/DNA molecules based on a combination of gold nanoparticles and single-chain DNA molecules. The record sensitivity up to 30-fM DNA concentration in a very small volume of 20 μL has been achieved in a rapid (15 min) easy-to-use immunochromatographic assay, which can be implemented even in the field [5]. The demonstrated limit of detection of 3×10^5 DNA molecules in a drop of the blood is promising for development of new diagnostic methods.

References:

1. *Orlov A.V. et al. Multiplex label-free biosensor for detection of autoantibodies in human serum: Tool for new kinetics-based diagnostics of autoimmune diseases // Biosensors and Bioelectronics. 2020. Vol. 159. P. 112187.*
2. *Nekrasov N. et al. Spectral-Phase Interferometry Detection of Ochratoxin A via Aptamer-Functionalized Graphene Coated Glass //Nanomaterials. 2021. Vol. 11, P. 226.*
3. *Levin A.D. et al. Dynamic light scattering biosensing based on analyte-induced inhibition of nanoparticle aggregation // Anal. Bioanal. Chem. 2020. Vol. 412, P. 3423–3431.*
4. *Cherkasov V.R. et al. Nanoparticle Beacons: Supersensitive Smart Materials with On/Off-Switchable Affinity to Biomedical Targets // ACS Nano. 2020. Vol. 14, P. 1792–1803.*
5. *Pushkarev A.V. et al. Rapid and Easy-to-Use Method for Accurate Characterization of Target Binding and Kinetics of Magnetic Particle Bioconjugates for Biosensing // Sensors. 2021. Vol. 21, P. 2802.*
6. *Znoyko S.L. et al. Nanomagnetic lateral flow assay for high-precision quantification of diagnostically relevant concentrations of serum TSH // Talanta. 2020. Vol. 216. P. 120961.*
7. *Bragina V.A. et al. Nanobiosensing based on optically selected antibodies and superparamagnetic labels for rapid and highly sensitive quantification of polyvalent hepatitis B surface antigen // Anal. Methods. 2021. Vol. 13, P. 2424–2433.*

УДК 543.9 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-240-242

МОДУЛЯЦИЯ СВОЙСТВ АПТАМЕРНЫХ АНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ С ПОМОЩЬЮ КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Самохвалов А.В.[1], **Сафенкова И.В.**[1], **Еремин С.А.**[2], **Жердев А.В.**[1], **Дзантиев Б.Б.**[1]

[1] *ИНБИ, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия;*
[2] *Химический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия.*
119071, Москва, Ленинский проспект, д.33
e-mail: 03alexeysamohvalov09@gmail.com

Рассмотрены возможности модуляции свойств аналитических систем на основе аптамеров посредством применения комплементарных олигонуклеотидов. Проведена количественная характеристика взаимодействия G-квадруплексного аптамера с панелью олигонуклеотидов разной длины и разной локализации сайтов связывания; ее результаты сопоставлены с данными о связывании аптамер – лиганд.

Ключевые слова: аптамер, гуаниновый квадруплекс, охратоксин А, ДНК дуплексы, анизотропия флуоресценции, изотермическая микрокалориметрия.

Использование в аналитических системах на основе взаимодействия аптамер – лиганд одноцепочечных олигонуклеотидов, комплементарно связывающихся с аптамером, предоставляет потенциальную возможность изменять пределы обнаружения и рабочие диапазоны систем. Однако существующая практика применения этого подхода ограничена эмпирическими описаниями отдельных сочетаний реагентов. Общие принципы их выбора для эффективной модуляции аналитических параметров остаются невыясненными. В связи с этим задачей проведенного исследования была сравнительная характеристика панели олигонуклеотидов, отличающихся по локализации и размерам участка связывания с аптамером.

В работе был использован аптамер, связывающий охратоксин А (ОТА) – микотоксин, контролируемый в растительных продуктах питания. Изучаемый ДНК аптамер, наиболее аффинный из известных аптамеров к ОТА, имеет последовательность 5'-GAT CGG GTG TGG GTG GCG TAA AGG GAG CAT CGG ACA-3' и в присутствии Ca^{2+} и Mg^{2+} сворачивается в антипараллельный G-квадруплекс, связывающий ОТА. Структура аптамера включает отличающиеся по стерической доступности участки – 5'-хвост (основания с 1-го по 5-е), квадруплекс (с 6-го по 25-е) и 3'-хвост (с 26-го по 36-е).

Сформирована панель из 24 одноцепочечных ДНК (оцДНК), комплементарных к различным участкам аптамера. Благодаря программным средствам Multiple Primer Analyzer и OligoCalc при дизайне оцДНК исключены возможности нецелевых взаимодействий: образование шпилек, димеризация оцДНК, множественные сайты связывания с аптамером. Число нуклеотидных звеньев варьировало от 5 до 10, число водородных связей (Н-связей) с аптамером – от 14 до 26.

Для взаимодействий аптамер–оцДНК методом изотермической микрокалориметрии определены термодинамические параметры и равновесные константы диссоциации (K_D), на основании которых можно выделить две группы оцДНК. 10 оцДНК, образующих более 23 Н-связей с аптамером, имеют K_D в диапазоне $4 \cdot 10^{-8}$–$2 \cdot 10^{-7}$ М. Для пяти оцДНК с количеством Н-связей 23 до 20 K_D варьирует от $2 \cdot 10^{-7}$ до 10^{-5} М. В пределах групп не наблюдается строгой корреляции между числом Н-связей и K_D, что может быть объяснено стерическими факторами. Отметим, что K_D взаимодействия аптамер–ОТА, измеренная методом микрокалориметрии, составляет $2 \cdot 10^{-8}$ М, что сопоставимо с K_D для оцДНК из первой группы.

С использованием меченного флуоресцеином ОТА и регистрации анизотропии флуоресценции, отражающей его переход из связанного с аптамером в свободное состояние, изучено влияние оцДНК на комплекс аптамер–лиганд. Показано, что оцДНК, формирующие с аптамером менее 18 Н-связей, не влияли на реакцию с лигандом, при росте числа связей до 20 наблюдались слабо выраженные эффекты. Все оцДНК, образующие более 20 Н-связей, препятствовали связыванию лиганда аптамером. Для этих оцДНК на основании полученных концентрационных зависимостей определены константы связывания с аптамером. Исследование кинетики изменения анизотропии показало, что для взаимодействий оцДНК с квадруплексным участком достижение равновесия требует до 30 мин., в отличие от быстрых взаимодействий оцДНК с хвостовыми участками аптамера.

Полученные данные позволяют выбрать оцДНК, способные модулировать параметры взаимодействия аптамер-лиганд и тем самым влиять на характеристики определения лиганда. Показано, что количество Н-связей, образуемых оцДНК, определяет их эффективность в качестве модуляторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-74-00112).

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-240-242

MODULATION OF APTAMERIC ANALYTICAL SYSTEMS PROPERTIES USING COMPLEMENTARY OLIGONUCLEOTIDES

Samokhvalov A.V.[1], **Safenkova I.V.**[1], **Eremin S.A.**[2], **Zherdev A.V.**[1], **Dzantiev B.B.**[1]

[1] *A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Center of Biotechnology of the Russian Acad. Sci., Moscow, Russia;*
[2] *Chemical Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*
119071 Moscow, Leninsky prospect 33
e-mail: 03alexeysamohvalov09@gmail.com

The possibilities of modulating the properties of analytical systems based on aptamers by using complementary oligonucleotides are considered. The quantitative characterization of the interaction of the G-quadruplex aptamer with a panel of oligonucleotides of different lengths and different localization of binding sites was carried out; its results are compared with data on aptamer - ligand binding.

Keywords: aptamer, G-quadruplex, DNA duplexes, fluorescence anisotropy, isothermal microcalorimetry.

The use of single-stranded oligonucleotides that complementarily bind to the aptamer in analytical systems based on the aptamer – ligand interaction provides potential for changing the detection limits and working ranges of systems. However, the current practice of applying this approach is limited to empirical descriptions of sporadic combinations of reagents. The general principles of their choice for efficient modulation of analytical parameters remain unclear. In this regard, the task of the study was a comparative characteristic of a panel of oligonucleotides that differ in localization and length of their aptamer-binding sites.

The aptamer that binds ochratoxin A (OTA), a mycotoxin controlled in plant foods, was used in the study. The studied DNA aptamer, the most affinity of the known aptamers for OTA, has the sequence 5'-GAT CGG GTG TGG GTG GCG TAA AGG GAG CAT CGG ACA-3' and in the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} folds into an antiparallel G-quadruplex that can bind OTA. The structure of the aptamer includes regions differing in steric accessibility – 5'-tail (bases 1st to 5th); quadruplex (6th to 25th) and 3'-tail (26th to 36th).

The panel of 24 single-stranded DNA (ssDNA) complementary to different parts of the aptamer was formed. Using Multiple Primer Analyzer and OligoCalc software, the ssDNA were designed excluding the possibility of off-target interactions: hairpin formation, dimerization of ssDNA, multiple sites for the aptamer binding. The number of nucleotide units varied from 5 to 10 and the number of hydrogen bonds (H-bonds) with the aptamer – from 14 to 26.

For aptamer – ssDNA interactions, thermodynamic parameters and equilibrium dissociation constants (K_D) were determined by isothermal microcalorimetry, on the basis of which two groups of ssDNA can be distinguished. 10 ssDNA forming more than 23 H-bonds with the aptamer have K_D in the range 4×10^{-8}–2×10^{-7} M. For five ssDNA with 23 to 20 H-bonds, K_D varies from 2×10^{-7} to 10^{-5} M. Within the groups, there is no strong correlation between the number of H-bonds and K_D, which can be explained by steric factors. Note that the K_D of the aptamer – OTA interaction, measured by microcalorimetry, is 2×10^{-8} M, which is comparable to the K_D for ssDNA from the first group.

The effect of ssDNA on the aptamer – ligand complex was studied using fluorescein-labeled OTA and recording anisotropy of fluorescence, reflecting its transition from aptamer-bound to a free state. It was shown that ssDNA forming less than 18 H-bonds with the aptamer did not affect the reaction with the ligand; weak effects were observed with an increase in the number of bonds to 20. All ssDNA forming more than 20 H-bonds prevented the binding of the ligand by the aptamer. For these ssDNA, the binding constants with the aptamer were determined on the basis of the obtained concentration dependences. The study of the kinetics of changes in anisotropy showed that for the interactions of ssDNA with the quadruplex region, reaching equilibrium takes up to 30 minutes, in contrast to the rapid interactions of ssDNA with the tail regions of the aptamer.

The data obtained make it possible to select ssDNA capable to modulate parameters of the aptamer-ligand interaction and thereby affect the characteristics of the ligand determination. It was shown that the number of H-bonds formed by ssDNA determines their efficiency as the modulators.

This study was financially supported by the Russian Science Foundation (project no. 20-74-00112).

УДК 543.9 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-242-244

АНАЛИТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАЗНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ЭКСПРЕССНОЙ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСНЫХ, ВИРОИДНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ РАСТЕНИЙ

Сафенкова И.В., Иванов А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
119071 Москва, Ленинский проспект, д.33
e-mail: irina.safenkova@gmail.com

Разработаны тест-системы для выявления фитопатогенов, сочетающие рекомбиназную полимеразную амплификацию и мембранные тест-полоски. Тест-системы обеспечивают выявление X вируса картофеля, вироида

веретеновидности клубней картофеля, возбудителя черной ножки картофеля (*Dickeya solani*), а также мультианализ трех вирусов. Амплификация проводится при 37 °С. Время анализа не превышает 30 мин.

Ключевые слова: изотермическая амплификация, иммунохроматографические тест-полоски, рекомбиназная полимеразная амплификация, фитопатогены

Растительные патогены приводят к снижению урожая и ухудшению его качества, являясь причиной значительных экономических потерь. Большинство проблем, вызываемых фитопатогенами, можно предотвратить при своевременном выявлении заражения растительного материала. Системы детекции фитопатогенов позволяют проводить эффективную диагностику на ключевых этапах жизненного цикла растения. Учитывая востребованность экспрессного, высокочувствительного и простого анализа, особый интерес вызывают системы, сочетающие амплификацию специфической нуклеотидной последовательности патогена и экспрессное распознавание продукта амплификации мембранными тест-полосками. Представленные разработки основаны на выборе рекомбиназной полимеразной амплификации (РПА) – уникального метода изотермической амплификации, проводимой при фиксированной низкой температуре (37-39 °С) в течение 15-20 минут.

Для разработки тест-систем были выбраны объекты разной природы: X, S и Y вирусы картофеля (ХВК, SBK, YBK), вирус скручивания листьев картофеля (ВСЛК), вироид веретеновидности клубней картофеля, бактериальный возбудитель черной ножки картофеля (*Dickeya solani*). Выбранные целевые последовательности (ампликоны), обеспечивающие уникальность распознавания, варьировали по длине от 107 до 256 п.н. Для каждого фитопатогена проведен дизайн нескольких пар РПА праймеров (прямой праймер с биотиновой меткой на 5'-конце, обратный праймер с флуоресцеином на 5'-конце) и экспериментально определена оптимальная пара, обеспечивающая высокую продуктивность амплификационного процесса при отсутствии неспецифических реакций как в РПА, так и на мембранных носителях. РПА проводили в течение 20 минут, при работе с РНК-объектами (вирусы и вироид) дополнительно добавляя в реакционную смесь РПА MMLV ревертазу для запуска обратной транскрипции. Полученные ампликоны на одном конце имели биотиновую метку, на противоположном – флуоресцеин. Для мульти-анализа вместо биотиновой метки вводили индивидуальный одноцепочечный ДНК фрагмент (баркод). Выявление ампликонов проводили с использованием мембранных тест-полосок, в аналитическую зону которых нанесен стрептавидин (моно-тесты) или стрептавидин с биотинилированным одноцепочечным фрагментом ДНК (анти-баркод), комплементарным баркоду, а в контрольную зону– антитела к иммуноглобулинам мыши. Для выявления комплексов, формирующихся в тестовой или контрольной зоне, использовали конъюгат наночастиц золота с антителами, специфичными к флуоресцеину. При опускании тест-полоски в раствор, полученный при амплификации, ампликоны формировали в тестовой зоне визуально выявляемый окрашенный комплекс (стрептавидин (или стрептавидин-антибаркод) – ампликон – конъюгат наночастиц золота). Общее время анализа, включая РПА, для всех разработанных тест-систем не превышало 30 мин. Предел обнаружения в моно-анализе: 0,14 нг вирусных частиц на грамм листа для ХВК, 1,4 x 10^4 клеток на грамм клубня для *D. solani*, 10^6 копий вироида на реакцию; в мульти-анализе: 500 нг/г для SBK, 1 нг/г для YBK, 10 пг/г для ВСЛК. Все результаты тестирования биопроб подтверждены коммерческими ПЦР наборами.

Разработанные системы позволяют выявить фитопатогены на этапе бессимптомного течения болезни, что обеспечивает их высокий диагностический потенциал. Благодаря сочетанию экспрессности и высокой чувствительности системы обладают конкурентным преимуществами как относительно традиционных иммунохроматографических тестов, так и относительно ПЦР анализа.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 16-16-04108) и Министерства образования и науки РФ.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-242-244

ANALYTICAL SYSTEMS BASED ON RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION FOR RAPID DETECTION OF VIRAL, VIROID AND BACTERIAL PLANT PATHOGENS

Safenkova I.V., Ivanov A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Leninsky prospect 33, e-mail: irina.safenkova@gmail.com

Test systems have been developed for the detection of phytopathogens, combining recombinase polymerase amplification and membrane test strips. Test systems provide detection of potato virus X, potato spindle tuber viroid, potato blackleg pathogen (*Dickeya solani*), as well as multi-analysis of three viruses. Amplification is carried out at 37 °C. The analysis time does n ot exceed 30 min.

Keywords: isothermal amplification, lateral flow assay, recombinase polymerase amplification, phytopathogens

Plant pathogens lead to a decrease in yield and a deterioration in its quality, which are the cause of significant economic losses. Most of the problems caused by phytopathogens can be avoided with timely detection of plant material contamination. Analytical systems for the detection of phytopathogens are an effective tool for detecting infection at key stages of the plant life cycle. Among the diagnostic systems that provide rapidity, high sensitivity, and ease of analysis, systems that combine amplification of specific nucleotide sequences of a pathogen and rapid recognition of the amplicons with membrane test strips deserve attention. The presented developments are based on the recombinase polymerase amplification (RPA) - a unique method of isothermal amplification carried out at a fixed low temperature (37-39 °C) for 15-20 minutes.

For the development of test systems, objects of different nature were selected: X potato virus (PVX), S potato virus (PVS), Y potato virus (PVY), potato leafroll virus (PLRV), potato spindle tuber viroid (PSTVd), a bacterial pathogen of potato blackleg (*Dickeya solani*). The selected target sequences (amplicons), providing the uniqueness of recognition, varied in length from 107 to 256 bp. For each phytopathogen, several pairs of RPA primers were designed (forward primer with a biotin tag at the 5 'end, reverse primer with fluorescein at the 5' end), after which the optimal pair was experimentally determined, providing high productivity of the amplification process and the absence of nonspecific reactions such as in RPA, and on membrane carriers. RPA was carried out for 20 minutes, while working with RNA objects (viruses and viroid), additionally adding RPA MMLV reverse transcriptase to the reaction mixture to trigger reverse transcription. The resulting amplicons had a biotin label at one end and fluorescein at the opposite end. For multi-assay, instead of a biotin label, an individual single-stranded (ss) DNA fragment (barcode) was introduced. The amplicons were identified using membrane test strips, in the test zone of which streptavidin (mono-tests) or streptavidin with a biotinylated ssDNA fragment (anti-barcode) complementary to the barcode were applied, and antibodies to mouse immunoglobulins were applied to the control zone. To stain the test and control zones, a conjugate of gold nanoparticles with monoclonal antibodies specific to fluorescein was used. When the test strip was dipped into a solution of the RPA mixture after amplification, the amplicons formed in the test zone a visually detectable colored complex [streptavidin (or streptavidin-antibarcode) - amplicon - conjugate of gold nanoparticles]. The total analysis time (including RPA for 20 min.) aor all developed test systems did not exceed 30 min. Mono-assay detection limit: 0.14 ng viral particles per gram of leaf for PVX, 1.4 x 10^4 cells per gram of tuber for *D. solani*, 10^6 viroid copies per reaction; in multi-assay: 500 ng/g for PVS, 1 ng/g for PVY, 10 pg/g for PLRV. All results were confirmed by commercial PCR kits.

The developed systems could identify phytopathogens at the stage of the asymptomatic course of the disease, which ensures their high potential. Due to the combination of rapidity and high sensitivity of the assay, the systems have competitive advantages over both traditional immunochromatographic tests and PCR assays.

This study was supported by the Russian Science Foundation (Grant 16-16-04108) and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

УДК 543.94 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-244-246

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ МИКРОРНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИЗОТЕРМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Сахаров И.Ю., Бодулев О.Л., Соловьев А.М.

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
119991, Москва, Ленинские горы, 1 стр.11Б
e-mail: sakharovivan@gmail.com

В данной работе будут представлены результаты разработки двух новых высокочувствительных гетерогенных методов определения микроРНК-141 и микроРНК-39 с использованием метода полимеризации и замещения и метода каталитической сборки шпилек для амплификации аналита.

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, методы изотермической амплификации, метод каталитической сборки шпилек, метод полимеризации и замещения, микроРНК

МикроРНК – это довольно обширный класс коротких (от 18 до 24 нуклеотидов) РНК-олигонуклеотидов. В организмах животных и растений уже найдено более 49000 микроРНК (по данным «miRbase»). Эти олигонуклеотиды играют критическую роль в таких клеточных процессах как пролиферация, миграция, апоптоз и т.д. Более того, микроРНК являются перспективными маркерами таких заболеваний как рак, сердечно-сосудистые и нервно-дегенеративные заболевания, поэтому развитие методов анализа микроРНК притягивает внимание широкого круга исследователей. В связи с низким содержанием микроРНК в биологических образцах и их высокой гомологией данные методы должны характеризоваться низким пределом обнаружения, высоким коэффициентов чувствительности и высокой селективностью. В данной работе будут представлены результаты разработки 2 новых высокочувствительных гетерогенных метода определения микроРНК-141 и микроРНК-39 с использованием метода полимеризации и замещения [1] и метода каталитической сборки шпилек [2] для амплификации аналита. С целью дополнительно повысить чувствительность этих методов анализа применялись конъюгат полипероксидазы со стрептавидином и реакция усиленной хемилюминесценции. Разработанные методы характеризовались высокой специфичностью и высокой чувствительностью; их предел обнаружения составил 100-300 фМ микроРНК-141. Разработанные методы позволили количественно оценить содержание микроРНК-141 в образцах клеточных культур SCF-7, HeLa, CaCo-2 и HepG2.

Авторы благодарят РФФИ за финансовую поддержку гранта 21-54-53007.

Литература

1. *Solovjev A. M., Galkin I. I., Pletjushkina O. Y., Medvedko A. V., Zhao S., Sakharov I. Y. Isothermal chemiluminescent assay based on circular stand-displacement polymerization reaction amplification for cel-miRNA-39-3p determination in cell extracts //International Journal of Biological Macromolecules. 2021. Vol. 182. P. 987-992.*
2. *Bodulev O. L., Zhao S., Sakharov I. Y. Improving the Sensitivity of the miRNA Assay Coupled with the Mismatched Catalytic Hairpin Assembly Reaction by Optimization of Hairpin Annealing Conditions //Analytical Chemistry. 2021. Vol. 93. № 17. P. 6824-6830.*

UDK 543.94 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-244-246

HIGHLY SENSITIVE METHODS FOR MICRORNA DETECTION USING ISOTHERMAL METHODS FOR NUCLEIC ACIDS AMPLIFICATION

Sakharov I.Yu., Bodulev O.L., Soloviev A.M.

Chemistry Department of Moscow State University, Moscow, Russia
119991, Moscow, Leninsky Gory, 1 bldg. 11B
e-mail: sakharovivan@gmail.com

This work will present the results of the development of two new highly sensitive heterogeneous methods for the determination of miRNA-141 and miRNA-39 using the isothermal circular strand-displacement amplification and the catalytic hairpin assembly methods for analyte amplification.

Key words: nucleic acids, isothermal amplification methods, catalytic hairpin assembly method, isothermal circular strand-displacement amplification, microRNA

MicroRNAs are a broad class of short (18 to 24 nucleotides in length) RNA oligonucleotides. More than 49,000 microRNAs have already been found in animal and plant organisms (according to database “miRbase”). These oligonucleotides play a critical role in cellular processes such as proliferation, migration, apoptosis, etc. Moreover, microRNAs are promising markers of diseases such as cancer, cardiovascular and neurodegenerative dysfunctions. By this, the development of microRNA analysis methods attracts the attention of a wide range of researchers. Due to the low microRNA content in biological samples and their high homology, these methods should be characterized by a low detection limit, high sensitivity coefficients, and high selectivity. This work will present the results of the development of two new highly sensitive heterogeneous methods for the determination of miRNA-141 and miRNA-39 using the isothermal circular strand-displacement amplification [1] and the catalytic

hairpin assembly method [2] used for analyte amplification. To improve the sensitivity of microRNA determination methods, a polyperoxidase-streptavidin conjugate and an enhanced chemiluminescence reaction were used. The developed methods were characterized by high specificity and high sensitivity; their detection limit was 100-300 fM microRNA-141. The developed methods made it possible to quantify the content of microRNA-141 in the samples of SCF-7, HeLa, CaCo-2, and HepG2 cell cultures.

The authors are grateful to the Russian Foundation for Basic Research for financial support, grant 21-54-53007.

References

1. *Solovjev A. M., Galkin I. I., Pletjushkina O. Y., Medvedko A. V., Zhao S., Sakharov I. Y. Isothermal chemiluminescent assay based on circular stand-displacement polymerization reaction amplification for cel-miRNA-39-3p determination in cell extracts //International Journal of Biological Macromolecules. 2021. Vol. 182. P. 987-992.*
2. *Bodulev O. L., Zhao S., Sakharov I. Y. Improving the Sensitivity of the miRNA Assay Coupled with the Mismatched Catalytic Hairpin Assembly Reaction by Optimization of Hairpin Annealing Conditions //Analytical Chemistry. 2021. Vol. 93. № 17. P. 6824-6830.*

УДК 577.112+577.18:57.083+602.68 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-246-248

МОНИТОРИНГ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ РЕЦЕПТОРА БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ В ПРОЦЕССАХ ЕГО ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ, ВЫДЕЛЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ В АНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Серченя Т.С.[1], **Семижон П.А.**[2], **Счесленок Е.П.**[2], **Горбачева И.В.**[1], **И.И. Вашкевич**[1], **Свиридов О.В.**[1]

[1] *Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*
220141, Минск, ул. академика В.Ф.Купревича, д.5, корп.2
e-mail: serchenya@tut.by
[2] *РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*
220141, Минск, ул. Филимонова, д. 23

Для технологий биоанализа бета-лактамных антибиотиков в пищевой продукции получен высокоочищенный рекомбинатный рецептор бета-лактамов BlaR-CTD. Разработана тест-система для количественного определения биологически активного и иммунореактивного рецептора в процессах его гетерологической экспрессии, выделения и приготовления реагентных форм. Исследованы иммунохимические свойства BlaR-CTD и его способность связывать антибиотики. Предложены конструкции и методики применения рецепторно-иммунных систем для анализа бета-лактамных антибиотиков в микропланшетах и на хроматографических тест-полосках.

Ключевые слова: рецептор бета-лактамных антибиотиков, BlaR-CTD, бета-лактамы, мониторинг активности, иммуноанализ, рецепторный анализ

В мировой биоаналитической практике все шире и эффективнее становится применение *in vitro* бактериальных белков, выполняющих *in vivo* функции рецепторов антибиотиков в клеточных системах лекарственной устойчивости. Так, клетки *Bacillus licheniformis* содержат трансмембранный рецепторный белок BlaR, связывающий бета-лактамные антибиотики и играющий роль сенсора-трансдуктора синтеза бета-лактамаз. Рецепторный сайт BlaR локализован во внеклеточном С-концевом домене (CTD). В биотехнологических исследованиях именно этот фрагмент белка BlaR-CTD гетерологически экспрессируется, очищается и приобретает форму базового реагента биоаналитических систем контроля содержания остаточных количеств бета-лактамных антибиотиков в пищевой продукции животного происхождения.

Поэтому важной задачей является мониторинг выходов активного рекомбинатного BlaR-CTD на стадиях продуцирования и очистки, а также количественная оценка стабильности рецептора в различных условиях технологической обработки и хранения. Помощь в успешном решении этой задачи должна оказать предлагаемая новая система детекции неповрежденных структур лигандсвязывающего центра и периферии макромолекулы BlaR-CTD.

Принцип действия разработанной рецепторно-иммунной системы сэндвич-ИФА–BlaR-CTD, основан на независимых биоспецифических реакциях рецепторного сайта и иммунореактивных эпитопов BlaR-CTD. Вначале белок связывается за счет своего активного центра с бета-лактамным антибиотиком в составе конъюгата с инертным белком, иммобилизованного на внутренней поверхности лунки полистирольного микропланшета. Затем экспонированный в раствор иммунореактивный фрагмент структуры связанного рецептора в роли антигена взаимодействует с очищенными поликлональными антителами к BlaR-CTD, конъюгированными с пероксидазой из корней хрена. Альтернативно немеченые первичные антитела могут использоваться для детекции BlaR-CTD в его комплексе с твердофазным бета-лактамом с последующим прибавлением пероксидазного конъюгата антивидового иммуноглобулина. По калибровочной кривой, основанной на активном BlaR-CTD, рассчитывается концентрация интактного рецептора в исследуемых пробах.

В работе получены все специфические компоненты и разработана конструкция сэндвич-ИФА–BlaR-CTD. Выбраны оптимальные концентрации реагентов для иммобилизации в лунках микропланшета и для взаимодействия в растворе с целью обеспечения наилучших показателей связывания и чувствительности. Установлены также условия долговременной стабилизации всех компонентов для обеспечения практического применения системы. Диапазон определяемых концентраций BlaR-CTD составляет 5-200 нг/мл, аналитическая чувствительность равна 2 нг/мл и коэффициент вариации результатов определений не превышает 7 %. Проведена апробация системы сэндвич-ИФА–BlaR-CTD в процессах экспрессии и очистки BlaR. Исследовано влияние температуры и продолжительности хранения, а также различных физико-химических факторов на рецепторную активность белка.

В системах микропланшетного анализа и на тест-полосках изучены лигандсвязвающие и иммунохимические свойства рекомбинантного BlaR-CTD. Показана применимость полученного рецептора для технологий биоанализа бета-лактамных антибиотиков в пищевых продуктах.

УДК 577.112+577.18:57.083+602.68 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-246-248

MONITORING OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF BETA-LACTAM ANTIBIOTICS RECEPTOR BLAR-CTD IN THE PROCESSES OF ITS HETEROLOGICAL EXPRESSION, PURIFICATION AND APPLICATION IN ANALYTICAL SYSTEMS

SerchenyaT.S.[1], **Semizhon P.A.**[2], **Scheslenok H.P.**[2], **Harbachova I.V.**[1], **Vashkevich I.I.**[1], **SviridovO.V.**[1]

[1] *Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk*
5/2 Academician V.F. Kuprevich St., Minsk, 220141, Belarus, e-mail: serchenya@tut.by
[2] *Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk*
23 Filimonova St., Minsk, 220114, Belarus

To develop the technologies of beta-lactam antibiotics bioassays in foods, high purity beta-lactam receptor BlaR-CTD has been obtained and characterized. A test system for the quantitation of the biologically active and immunoreactive receptor in the processes of its heterological expression, isolation and reagent forms preparation was elaborated. The immunochemical properties and antibiotic binding ability of BlaR-CTD were investigated, and the constructions and application procedures of receptor-immune systems for the assay of beta-lactam antibiotics using microplates or chromatographic test-strips were proposed.

Keywords: beta-lactam antibiotics receptor, BlaR-CTD, beta-lactam, monitoring, immunoassay, receptor assay

In the world bioanalytical practice, the use of bacterial proteins *in vitro*, which perform the functions of antibiotic receptors in the cellular systems of drug resistance *in vivo*, is becoming wider and more effective. Thus, *Bacillus licheniformis* cells contain transmembrane receptor protein BlaR binding beta-lactam antibiotics and playing the role of a sensor-transducer of beta-lactamase synthesis. The BlaR receptor site is located in the extracellular C-terminal domain (CTD). In biotechnological studies, this fragment BlaR-CTD is heterologically expressed, purified and converted into the form of a basic reagent of a bioanalytical system to control the content of beta-lactam antibiotics residues in foods of animal origin. Therefore, the important task is to monitor the yields of active recombinant BlaR-CTD at the stages of production and purification and to quantitatively assess the receptor stability under various conditions of technological processing and storage. The proposed new system for detecting intact structures of the ligand-binding site and the periphery of the BlaR-CTD macromolecule should assist in the successful solution of this problem. The

principle of the developed receptor-immune system sandwich-ELISA–BlaR-CTD is based on independent biospecific reactions of the receptor site and immunoreactive epitopes of BlaR-CTD. Initially, the receptor couples through its binding site to a beta-lactam antibiotic conjugated with an inert protein, which is immobilized onto the inner surface of a polystyrene microplate well. Then, the immunoreactive fragment of the bound receptor exposed into the solution interacts as an antigen with purified polyclonal antibodies to BlaR-CTD conjugated with horseradish peroxidase. Alternatively, unlabeled primary antibodies can be used to detect BlaR-CTD in its complex with solid phase beta-lactam followed by the addition of an anti-species immunoglobulin peroxidase conjugate. A calibration curve based on pure fully active BlaR-CTD is used to calculate the intact receptor concentration in the unknown samples. In this work, all specific components were obtained and the construction of sandwich-ELISA–BlaR-CTD was developed. The optimal concentrations of the reagents for immobilization in microplate wells and for interaction in solution were selected to ensure the best binding and sensitivity characteristics. The conditions for long term stabilization of all components were also established to make possible the practical application of the system. The BlaR-CTD concentrations range determined by the sandwich-ELISA is 5-200 ng/ml, analytical sensitivity is 2 ng/ml and the coefficient of variation does not exceed 7 %. The sandwich-ELISA–BlaR-CTD was tested in the processes of BlaR-CTD expression and purification. The influence of the temperature and duration of storage and various physicochemical factors on the receptor activity of the protein was investigated. Ligand-binding and immunochemical properties of recombinant BlaR-CTD were studied in microplate assay systems and with the use of test strips. The applicability of the obtained BlaR-CTD for the technologies of beta-lactam antibiotics bioassays in foods was shown.

УДК 544.653.2; 543.645.9 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-248-250

ДЕЗОКСИУРИДИНТРИФОСФАТЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ АРОМАТИЧЕСКИМИ ГРУППАМИ ТИРОЗИНА ИЛИ ТРИПТОФАНА, ДЛЯ ПРЯМОГО ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДВУНИТЕВЫХ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК

Супрун Е.В.[1], **Хмелёва С.А.**[1], **Кутдусова Г.Р.**[2], **Дускаев И.Ф.**[2], **Птицын К.Г.**[1], **Кузнецова В.Е.**[3], **Лапа С.А.**[3], **Чудинов А.В.**[3], **Радько С.П.**[1]

[1] *ФГБНУ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8, lenasuprun@mail.ru*
[2] *ФГБОУВО Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия 119991, Москва, Ленинские горы, 1*
[3] *ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия 119991, Москва, ул. Вавилова, 32*

Набор дезоксиуридинтрифосфатов, модифицированных ароматическими группами тирозина или триптофана, был исследован в качестве субстратов для амплификации (полимеразной цепной реакцией или рекомбиназной полимеразной амплификацией) и в качестве носителей электроактивной «метки» для прямого электрохимического определения двунитевой ДНК.

Ключевые слова: нуклеиновая кислота, модифицированный нуклеотид, тирозин, триптофан, амплификация.

Нуклеиновые кислоты представляют большой интерес для развития современных биоаналитических технологий как маркеры различных заболеваний и индикаторы загрязнения окружающей среды. Целью настоящей работы стало объединение биохимической амплификации ДНК с электрохимическим определением концентрации полученных двунитевых ДНК ампликонов (днДНК) путем ведения в ферментативную реакцию электроактивных «меченых» нуклеотидов. Ранее нами было показано, что образование двойной спирали затрудняет прямое электрохимическое окисление днДНК через остатки гуанина или аденина, которые становятся недоступными для реакций на поверхности электрода [1]. Для решения проблемы электроактивности днДНК были изучены пять производных 2'-дезоксиуридин-5'-трифосфата (дУТФ), модифицированных через различные линкеры ароматическими группами тирозина (Тир) или триптофана (Трп). Методом квадратно-волновой вольтамперометрии на печатных графитовых электродах были получены пики окисления всех модифицированных дУТФ при потенциалах 0.5–0.7 В, аналогично свободным Тир или Трп. Одновременно синтезированные нуклеотиды были проверены в качестве субстратов полиме-

раз в полимеразной цепной реакции (ПЦР) и в изотермической рекомбиназной полимеразной амплификации (РПА) – наиболее широко используемых видах амплификации ДНК [2]. Все пять производных дУТФ, показали хорошую совместимость с ПЦР при включении электроактивной «метки» в виде остатка Тир или Трп в ампликоны днДНК длиной 1–2 сотни п. о. [3]. Однако из пяти только два нуклеотида с ароматическими группами Тир, а именно 5-аминоаллил-дУТФ, модифицированный 4-гидроксифенилуксусной кислотой или 4-гидроксифенилакриловой кислотой, продемонстрировали совместимость с РПА. Вероятно, это связано со сравнительно небольшим размером остатка Тир относительно Трп, что более благоприятно для ферментативных реакций. Модифицированные днДНК-ампликоны, полученные с помощью ПЦР или РПА, были определены в микромолярных концентрациях путем окисления электроактивной «метки», в то время как в тех же условиях сигналы окисления немодифицированных днДНК не наблюдались. Полученные результаты открывают новые горизонты для создания портативных электрохимических анализаторов, позволяющих проводить измерения интересующих биомолекул *in situ* и помогающих решить различные биохимические, медицинские, экологические или повседневные задачи.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект №19-14-00247).

Литература

1. *Suprun E.V. Towards deeper understanding of DNA electrochemical oxidation on carbon electrodes / E.V. Suprun, G.R. Kutdusova, S.A. Khmeleva, S.P. Radko // Electrochem. Commun. – 2021. – V. 124. – № 106947.*
2. *Zhao Y. Isothermal amplification of nucleic acids / Y. Zhao, F. Chen, Q. Li, L. Wang, C. Fan // Chem. Rev. – 2015. – V. 115. – P. 12491–12545.*
3. *Suprun E.V. Deoxyuridine triphosphates modified with tyrosine or tryptophan aromatic groups for direct electrochemical detection of double-stranded DNA / E.V. Suprun, S.A. Khmeleva, G.R. Kutdusova, I.F. Duskaev, V.E. Kuznetsova, S.A. Lapa, A.V. Chudinov, S.P. Radko // Electrochim. Acta. – 2020. – V. 362. – № 137105.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-248-250

DEOXYURIDINE TRIPHOSPHATES MODIFIED WITH AROMATIC GROUPS OF TYROSINE OR TRYPTOPHAN FOR DIRECT ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF DOUBLE-STRANDED DNA AMPLIFICATION PRODUCTS

Suprun E.V.[1], **Khmeleva S.A.**[1], **Kutdusova G.R.**[2], **Duskaev I.F.**[2], **Ptitsyn K.G.**[1], **Kuznetsova V.E.**[3], **Lapa S.A.**[3], **Chudinov A.V.**[3], **Radko S.P.**[1]

1 Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia
119121 Moscow, Pogodinskaya Street, 10/8, lenasuprun@mail.ru
2 M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119991, Moscow, Lenin Hills, 1
3 Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow
Russia, 119991, Moscow, Vavilov Street, 32

A set of deoxyuridine triphosphates modified with aromatic groups of tyrosine or tryptophan was studied as substrates for amplification (by polymerase chain reaction or recombinase polymerase amplification) and as carriers of an electroactive 'label' for direct electrochemical detection of double-stranded DNA.

Key words: nucleic acid, modified nucleotide, tyrosine, tryptophan, amplification.

Nucleic acids are of great interest for the development of modern bioanalytical technologies as markers of various diseases and indicators of environmental pollution. The aim of this work was to combine the biochemical amplification of DNA with electrochemical detection of the generated double-stranded DNA amplicons (dsDNA) by introducing electroactive 'labeled' nucleotides into an enzymatic reaction. We have previously shown that the formation of a double helix hinders the direct electrochemical oxidation of dsDNA through guanine or adenine residues which become inaccessible for reactions on the electrode surface [1]. To solve the problem of dsDNA electroactivity, five derivatives of 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate (dUTP) modified via various linkers by aromatic groups of tyrosine (Tyr) or tryptophan (Trp) were studied. By the method of square wave voltammetry on carbon screen printed electrodes, the oxidation peaks of all modified dUTP were obtained at potentials of 0.5–0.7 V, similar to free Tyr or Trp. Simultaneously,

the synthesized nucleotides were tested as polymerase substrates in polymerase chain reaction (PCR) and in isothermal recombinase polymerase amplification (RPA) – the most widely used types of DNA amplification [2]. All five derivatives of dUTP showed a good compatibility with PCR, when an electroactive 'label' was introduced as a Tyr or Trp residue into dsDNA amplicons with a length of 1–2 hundred b. p. [3]. However, only two nucleotides with aromatic groups of Tyr out of the five tested, namely 5-aminoallyl-dUTP modified with 4-hydroxyphenylacetic acid or 4-hydroxyphenylacrylic acid, demonstrated a compatibility with RPA. This is probably due to the relatively small size of the Tyr residue compared to that of Trp, that is more favorable for enzymatic reactions. Modified dsDNA amplicons obtained by PCR or RPA were detected at micromolar concentrations by direct oxidation of the electroactive 'label', while under the same conditions no oxidation signals were registered for unmodified dsDNA. The obtained results open up new horizons for a development of portable electrochemical analyzers that allow *in situ* measurements of biomolecules of interest and help to solve various biochemical, medical, environmental, or everyday tasks.

This work was financially supported by the Russian Science Foundation, grant 19-14-00247.

References

1. *Suprun E.V. Towards deeper understanding of DNA electrochemical oxidation on carbon electrodes / E.V. Suprun, G.R. Kutdusova, S.A. Khmeleva, S.P. Radko // Electrochem. Commun. – 2021. – V. 124. – № 106947.*
2. *Zhao Y. Isothermal amplification of nucleic acids / Y. Zhao, F. Chen, Q. Li, L. Wang, C. Fan // Chem. Rev. – 2015. – V. 115. – P. 12491–12545.*
3. *Suprun E.V. Deoxyuridine triphosphates modified with tyrosine or tryptophan aromatic groups for direct electrochemical detection of double-stranded DNA / E.V. Suprun, S.A. Khmeleva, G.R. Kutdusova, I.F. Duskaev, V.E. Kuznetsova, S.A. Lapa, A.V. Chudinov, S.P. Radko // Electrochim. Acta. – 2020. – V. 362. – № 137105.*

УДК 577.152 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-250-252

ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТРЕССОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА ЖИВЫЕ СИСТЕМЫ

Угарова Н.Н.[1], **Ломакина Г.Ю.**[1,2]

[1] *Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия 119991, Москва, Ленинские горы, 1*
[2] *МГТУ имени Э.Н. Баумана*
e-mail: nugarova@gmail.com

Разработаны биолюминесцентные методы на основе люциферазы светляков для детекции эффекта мембранно-активных агентов (антибиотиков и сапонинов) на живые прокариотические и эукариотические клетки. Получены новые данные о кинетике и механизме действия колистина на клетки *E. coli* и дигитонина - на клетки HEK293. Приведены примеры использования конститутивных и индуцибельных люциферазных репортеров в молекулярной биологии.

Ключевые слова: биолюминесценция, люцифераза светляков, ATP, колистин, дигитонин, клетки *E. coli*, клетки HEK293, люциферин.

Для изучения стрессовых воздействий на живые системы используются разнообразные методы детекции, среди которых большой интерес представляют биолюминесцентные методы благодаря высокой чувствительности, специфичности и возможности их применения в неинвазивном анализе клеток и целых животных в реальном времени, в условиях *in vivo* или *in situ*. В данном докладе приведены примеры из литературы и из собственных работ авторов по применению биолюминесцентных систем для детекции влияния различных агентов на биосистемы.

Биолюминесценция – это свечение в видимой области спектра, которое возникает при окислении низкомолекулярных субстратов – люциферинов, катализируемом ферментами – люциферазами. Большой интерес представляет люцифераза светляков, субстратами которой являются D-люциферин, ATP и кислород. Благодаря высокой активности и абсолютной специфичности к ATP, люциферазы светляков широко используются для детекции ATP - маркера жизнеспособности клетки. Установлена прямая пропорциональность между содержанием ATP и количеством жизнеспособных клеток в образце. По

снижению уровня АТР при действии стрессовых агентов (излучение, нагревание, добавки токсинов, антибиотиков) люциферин-люциферазный метод позволяет быстро детектировать изменения во внутриклеточных процессах.

Изучение кинетики взаимодействия мембранно-активного антибиотика колистина с клетками *E. coli* показало, что клетки теряют АТР не только вследствие увеличения проницаемости клеточной мембраны, но и из-за пертурбаций в структуре внешней и цитоплазматической мембран. В результате резко снижается активность мембранных ферментов, катализирующих синтез АТР. Для эукариотических клеток HEK293, транзиентно трансфицированных плазмидой pcDNALuc, экспрессирующей люциферазу светляков, было изучено литическое действие диготонина, который образует комплексы с холестерином клеточных мембран. Это приводит к образованию пор и высвобождению внутриклеточных компонентов в реакционную среду. Выявлены особенности взаимодействия различных концентраций дигитонина с клетками на ранних стадиях лизиса клеток.

Люциферазные репортеры широко используются в клеточной биологии. Хотя они и менее яркие, чем флуоресцентные, но обладают рядом преимуществ: не требуют внешнего облучения и имеют очень низкий фоновый сигнал. Особым свойством люциферин-люциферазной системы светляков является продолжительное свечение, что позволяет изучать процессы в живых клетках и интактных животных в течение нескольких дней и даже недель с высоким разрешением – вплоть до одной клетки. Для мониторинга люциферазной активности в режиме реального времени используются индуцибельные репортерные векторы, которые содержат промоторы для исследуемого гена и гена люциферазы. Для клеток, трансфицированных таким вектором, по уровню экспрессии люциферазы в режиме реального времени детектируют экспрессию исследуемого гена и действие различных агентов на этот процесс. Приведены примеры использования конститутивных и индуцибельных люциферазных систем в исследовании стрессовых воздействий на клетки.

Работа выполнена в рамках госрегистрационной темы МГУ имени М.В. Ломоносова
АААА-А21-121011290089-4.

UDK 577.152 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-250-252

APPLICATION OF BIOLUMINESCENT METHODS TO STUDY STRESS EFFECTS ON LIVING SYSTEMS

Ugarova N.N.[1], **Lomakina G.Yu.**[1,2]

[1] *Faculty of Chemistry, Lomonossov Moscow State University, Moscow, Russia,119991, Moscow, Lenin Hills,1*
[2] *Bauman Moscow State Technical University, Moscow, Russia*
e-mail: nugarova@gmail.com

Bioluminescent methods based on firefly luciferase for detecting the effect of membrane-active agents (antibiotics and saponins) on living prokaryotic and eukaryotic cells have been developed. New data on the kinetics and mechanism of action of colistin on *E. coli* cells and digitonin cells on NEK293 cells were obtained. Examples of the use of constitutive and inducible luciferase reporters in cell biology are given.

Keywords: bioluminescence, firefly luciferase, ATP, colistin, digitonin, *E. coli* cells, NEK293 cells, luciferin.

To study stress effects on living systems, a variety of detection methods are used, among which bioluminescent methods are of great interest due to their high sensitivity, specificity and the possibility of their application in non-invasive analysis of cells and entire animals in real time, *in vivo* or *in situ*. This report provides examples from the literature and from the authors' own works on the use of bioluminescent systems to detect the influence of various agents on biosystems.

Bioluminescence is a light emission in the visible region of the spectrum, which occurs during the oxidation of low-molecular substrates - luciferins, catalyzed by enzymes - luciferases. Of great interest is the firefly luciferase, the substrates of which are D-luciferin, ATP and oxygen. Due to the high activity and absolute specificity to the ATP, firefly luciferases are widely used to detect ATP - a marker of cell viability. A direct proportionality between the content of ATP and the number of viable cells in the sample was established. To detect the changes of the ATP level under the action of stress agents (radiation, heating, additives of toxins, antibiotics), the luciferin-luciferase method was used.

The study of the kinetics of the interaction of the membrane-active antibiotic colistin with *E. coli* cells showed that cells lose ATP not only due to an increase in the permeability of the cell membrane, but also due to perturbations in the structure of the external and cytoplasmic membranes. As a result, the activity of membrane enzymes that catalyze the synthesis of ATP is sharply reduced. For eukaryotic cells NEK293, transiently transfected by the plasmid pcDNALuc, expressing the firefly luciferase, the lytic effect of digotonin, which forms complexes with cholesterol of cell membranes, was studied. This leads to the formation of pores and the release of intracellular components into the reaction medium. The features of the interaction of various concentrations of digitonin with cells in the early stages of cell lysis are revealed.

Luciferase reporters are widely used in cell biology. Although they are less bright than fluorescent, they have a number of advantages: they do not require external irradiation and have a very low background signal. A special property of the luciferin-luciferase system of fireflies is a prolonged glow, which allows you to study the processes in living cells and intact animals for several days and even weeks with high resolution - up to one cell. To monitor luciferase activity in real time, inducible reporter vectors are used, which contain promoters for the studied gene and the luciferase gene. For cells transfected by such a vector, the level of expression of luciferase in real time detects the expression of the studied gene and the action of various agents on this process. Examples of the use of constitutive and inducible luciferase systems in the study of stress effects on cells are given.

This work was financially supported by the State Budget of Lomonossov Moscow State University, Project No AAAA-A16-116052010081-5.

УДК 577.113.5, 54.061, 54.066 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-252-254

ГИБРИДИЗАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ НА КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИХ БИОЧИПАХ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ У БАКТЕРИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К АНТИБИОТИКАМ

Филиппова А.А.[1], **Рубцова М.Ю.**[1], **Фурсова Н.К.**[2],
Преснова Г.В.[1], **Уляшова М.М.**[1], **Григоренко В.Г.**[1], **Егоров А.М.**[1]

[1] *Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия*
119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр.3
e-mail: iiffii@mail.ru
[2] *ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск, Россия*
142279, Московская обл., Серпуховский район, п. Оболенск

Разработан метод гибридизационного анализа на колориметрических биочипах для количественного определения нуклеиновых кислот. Оптимизированы условия проведения анализа и алгоритм обработки цифровых изображений биочипов с использованием разных цветовых моделей. Показана возможность использования данного метода для количественного определения ДНК и мРНК сериновых бета-лактамаз у грамотрицательных бактерий, устойчивых к бета-лактамным антибиотикам.

Ключевые слова: гибридизационный анализ, ДНК, мРНК, колориметрические биочипы, антибиотикорезистентность, бета-лактамазы

Широкое распространение грамотрицательных патогенных бактерий, устойчивых к различным классам антибиотиков, представляет глобальную угрозу. Для характеристики резистентных к антибиотикам бактерий активно развиваются молекулярно-генетические методы. Гибридизационный мультианализ нуклеиновых кислот на биочипах характеризуется высокой мультиплексностью и производительностью и перспективен для решения различных задач молекулярной микробиологии и эпидемиологии. Ранее нами было разработана технология колориметрических биочипов, основанная на аллель-специфической гибридизации меченой ДНК-мишени со специфическими олигонуклеотидными зондами и выявлении метки-биотина с использованием колориметрической детекции на основе пероксидазы хрена. Метод был разработан для идентификации ДНК (определения наличия или отсутствия исследуемого гена) и обнаружения мутаций в генах. В то же самое время возможности технологии колориметрических биочипов существенно шире и позволяют проводить количественное определение ДНК.

В данной работе оптимизированы условия гибридизационного анализа на биочипах в лунках 96-луночных планшетов для количественного определения ДНК. В результате комплементарной гибридизации

ДНК-мишени и последующей детекции происходит окрашивание определенных зон биочипа вследствие образования нерастворимого продукта ферментативной реакции синего цвета. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации ДНК-мишени. В качестве модельных ДНК были использованы одноцепочечный олигонуклеотид из 19 о. и двухцепочечная ДНК из 851 п.о., последовательность которой соответствует полноразмерному гену сериновой бета-лактамазы TEM-1, обусловливающей устойчивость грамотрицательных бактерий к бета-лактамным антибиотикам.. Было проведено сравнительное изучение алгоритмов перевода цифровых изображений зон биочипа синего цвета в монохромное черно-белое и выбран алгоритм, обеспечивающий максимальный динамический диапазон интенсивностей окрашивания. Предел обнаружения модельного олигонуклеотида составил 0,4±0,04 пмоль/мл, предел обнаружения ДНК бета-лактамаз TEM типа составил 7,0±0,08 пмоль/мл.

Разработанный метод был применен для количественного анализа мРНК бета-лактамаз TEM типа, продуцируемых лабораторными и клиническими штаммами грамотрицательных бактерий с различной чувствительностью к бета-лактамным антибиотикам. Для этого из бактериальных клеток получали фракцию общей РНК, из нее получали первую цепь кДНК реакцией обратной транскрипции и амплифицировали полноразмерный ген исследуемой бета-лактамазы. Предел обнаружения мРНК бета-лактамазы TEM-1 составил 0,4±0,05 амоль/мл.

Разработанный метод может быть использован для изучения механизмов развития и подавления резистентности у мультирезистентных к антибиотикам бактерий.

Работа выполнялась в рамках государственного задания (тема № АААА-А21-121011290089-4).

UDK 577.113.5, 54.061, 54.066 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-252-254

HYBRIDIZATION ANALYSIS ON COLORIMETRIC BIOCHIPS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF BETA-LACTAMASE GENES IN ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIA

Filippova A.A.[1], Rubtsova M.Yu.[1], Fursova N.K.[2], Presnova G.V.[1], Ulyashova M.M.[1], Grigorenko V.G.[1], Egorov A.M.[1]

[1] *Chemistry Department of M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*
1, 3, Moscow State University, Leninskie Gory, 119991 Moscow, Russia
e-mail: iiffii@mail.ru
[2] *State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia*
142279, Moscow region, Serpukhovsky district, Obolensk

A method of hybridization analysis on colorimetric biochips for the quantitative determination of nucleic acids has been developed. The assay conditions and the method of processing digital images of biochips using different color models have been optimized. The method was applied for the quantitative determination of DNA and mRNA of serine beta-lactamases in Gram-negative bacteria resistant to beta-lactam antibiotics.

Keywords: hybridization analysis, DNA, mRNA, colorimetric biochips, antibiotic resistance, beta-lactamase

Wide spread of Gram-negative pathogenic bacteria resistant to various classes of antibiotics poses a global threat. Molecular genetic methods are being actively developed to characterize antibiotic-resistant bacteria. Hybridization multi-analysis of nucleic acids on biochips is characterized by high multiplexity and high throughput and it is promising for solving various problems of molecular microbiology and epidemiology. Previously, we developed a technology for colorimetric biochips based on allele-specific hybridization of a labeled target DNA with specific oligonucleotide probes and detection of a biotin label using colorimetric detection based on horseradish peroxidase. The method was developed to identify DNA (determine the presence or absence of the gene under study) and detect single mutations in the genes. At the same time, the capabilities of colorimetric biochip technology are much wider and allow the quantitative determination of DNA.

In this work, the conditions for hybridization analysis on biochips in the wells of 96-well plates and for quantitative determination of DNA were optimized. As a result of complementary hybridization of the target DNA and subsequent detection, certain spots of the biochip are stained due to the formation of an insoluble blue product of the enzymatic reaction. The intensity of the staining is directly proportional to the concentration of the target DNA. A single-stranded oligonucleotide of 19 bases and double-stranded DNA of 851 base pairs, which sequence

corresponds to the full-length gene of serine beta-lactamase TEM-1, conferring the resistance of Gram-negative bacteria to beta-lactam antibiotics, were used as model DNAs. Algorithms for converting digital images of blue colour into monochrome black and white were optimized, and an algorithm was chosen that provides the maximum dynamic range of staining intensities. The detection limit of the model oligonucleotide was 0.4±0.04 pmol/mL, the detection limit of TEM type beta-lactamase gene was 7.0±0.08 pmol/mL.

The developed method was applied for the quantitative analysis of mRNA of TEM type beta-lactamases produced by laboratory and clinical strains of Gram-negative bacteria with different sensitivity to beta-lactam antibiotics. For this, a fraction of total RNA was isolated from the bacterial cells, the cDNA strand was obtained from it by the reverse transcription reaction, and the full-length gene of the studied beta-lactamase was amplified. The detection limit for mRNA of beta-lactamase TEM-1 was 0.4±0.05 amol/mL. The developed method can be used to study the mechanisms of development and suppression of resistance in multi-antibiotic-resistant bacteria.

The work was supported by the Government program AAAA-A21-121011290089-4.

УДК 543.421/.424 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-254-255

РАМАНОВСКИЕ МЕТКИ С УСИЛЕНИЕМ ПОЛЯ В ЗАЗОРЕ ДЛЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ И БИОИМИДЖИНГА

Хлебцов Б.Н., Ханадеев В.А., Буров А.М., Хлебцов Н.Г.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия
410049, Саратов, пр. Энтузиастов, д.13
e-mail: khlebtsov_b@ibppm.ru

В докладе обсуждается применение нового типа Рамановских меток с усилением поля в зазоре для аналитических приложений и биовизуализации

Ключевые слова: Рамановские метки, иммуноанализ, биоимиджинг

Рамановские метки с усилением поля в зазоре (GERTs) - это новый класс зондов для спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния, которые нашли многообещающие применения в аналитической химии и биоимиджинге. Из-за внутренней локализации Рамановских репортерных молекул они защищены от нежелательной внешней среды и агрегации частиц и демонстрируют сверхвысокий сигнал ГКР, обусловленный усилением электромагнитных полей в зазорах внутри металлических структур вида ядро-оболочка. Мы обсуждаем недавний прогресс в синтезе, исследовании оптических свойств и биомедицинских приложениях новых сферически-симметричных и анизотропных GERTs. Особое внимание уделяется использованию наночастиц в качестве меток для иммуноанализа и для Рамановского биоимиджинга раковых клеток и тканей.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-254-255

GAP-ENHANCED RAMAN TAGS FOR ANALITICAL AND BIOIMAGING APPLICATIONS

Khlebtsov B.N., Khanadeev V.A., Burov A.M., Khlebtsov N.G.

Institute of biochemistry and physiology of plants and microorganisms RAS, Saratov, Russia
410049, Saratov, pr. Entuziastov, 13
e-mail: khlebtsov_b@ibppm.ru

We discuss recent progress in the synthesis, design of optical properties, analytical and bioimaging applications of novel gap-enhanced Raman tags.

Keywords: SERS tags, immunoassay, bioimaging

Gap-enhanced Raman tags (GERTs) are new emerging probes of the surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy that have found promising analytical and bioimaging applications. Because of the internal localization of Raman reporter molecules, they are protected from unwanted external environments and particle aggregation and demonstrate superior SERS responses due to strongly enhanced electromagnetic fields in the gaps between metal core-shell structures. We discuss recent progress in the synthesis, design of optical properties, and biomedical applications of novel spherically symmetrical and anisotropic GERTs. Particular attention is paid to the use of nanoparticles as labels for immunoassays and for Raman bioimaging of cancer cells and tissues.

УДК 60:619:577 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-255-257

ВЫЯВЛЕНИЕ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ОТВЕТА К РЕКОМБИНАНТНОМУ БЕЛКУ DNAK CHLAMYDIA PSITTACI МЕТОДОМ DOT-ELISA

Ляпина А.М.[1], **Хижнякова М.А.**[1], **Кичемазова Н.В.**[1],
Колосова А.А.[1], **Евстифеев В.В.**[2], **Ларионова О.С.**[3], **Федорова В.А.**[1*]

[1] *Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», Саратов, Россия*
410028, г. Саратов, ул. 53 Стрелковой Дивизии, д.6
[2] *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»*
420075, Республика Татарстан, г. Казань, Научный городок, 2
[3] *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»*
410012, г. Саратов, Театральная пл.,1
** e-mail: feodorovav@mail.ru*

Представлены результаты применения dot-ELISA для выявления специфических IgG к рекомбинантному антигену DnaK *Chlamydia psittaci* в сыворотках крови сельскохозяйственных животных, привитых коммерческой вакциной против хламидиоза. Выявлено участие рекомбинантного белка DnaK *C. psittaci* в иммунном ответе у овец, иммунизированных вакциной на основе штамма *C. psittaci* Ростиново-70.

Ключевые слова: Dot-ELISA, DnaK, *Chlamydia psittaci*

Dot-ELISA (DE) представляет собой вариант твердофазного иммуноферментного анализа, основанного на детекции комплекса «антиген-антитело», выявляемого путем проявления цветной реакции конъюгированного с антителом фермента и хромогенного субстрата. Преимуществом данного метода перед другими иммуноферментными тестами, помимо экспрессности и простоты методики, является возможность сорбции белков разной молекулярной массы за счет использования в качестве твердой фазы полимерных мембран с определенным диаметром пор [1]. Хламидиоз сельскохозяйственных животных (СХЖ), этиологическим фактором которого являются бактерии рода *Chlamydia*, представляет серьезную угрозу для аграрного сектора экономики и здравоохранения. Ранее нами было показано наличие в геноме вакцинного штамма *C. psittaci* Ростиново-70 (Р-70), используемого для профилактики хламидиоза СХЖ в РФ, рекомбинатной вставки из *C. abortus* [2]. В указанном регионе был обнаружен, в том числе, ген, кодирующий белок теплового шока DnaK, обладающий способностью активировать компоненты врожденного и адаптивного иммунитета [3]. Цель работы – выявление методом DE специфических антител к рекомбинантному белку DnaK *C. psittaci* в сыворотках крови СХЖ, привитых вакциной на основе Р-70. В качестве сенситина использовали рекомбинантный белок DnaK, очищенный от эндотоксина (AtaGenix Laboratories, Ухань, КНР). Положительным контролем служила инактивированная взвесь бактерий Р-70, отрицательным - фосфатно-солевой буфер (PBS). Сыворотки крови (n=8) были получены от овец, иммунизированных Р-70. Антигены наносили в объеме 1 мкл на нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0,2 мкм (Bio-Rad Laboratories, США) и фиксировали в термостате. Блокировку свободных участков иммуносорбента проводили раствором 1% лактоальбумина в PBS на шейкере. Промывки осуществляли PBS, содержащим 0,05% Tween 20 (Helicon, Россия). Специфическую реакцию визуализировали с помощью антивидового конъюгата, меченного пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США), и водонерастворимого хромогенного субстрата (TMB, Sigma-Aldrich, США).

Нами показано, что 100 % сывороток (8/8) реагировали с инактивированной взвесью бактерий Р-70 при отсутствии взаимодействия антител с отрицательным контролем. При этом 75% (6/8) исследуемых образцов были серопозитивны к рекомбинантному белку DnaK. Таким образом, в нашем исследовании продемонстрирована возможность применения DE для выявления специфических антител в сыворотках иммунизированных против хламидиоза овец к белку теплового шока DnaK *C. psittaci*. Полученные результаты свидетельствуют также о вероятном участии DnaK в иммунном ответе, индуцируемом вакциной на основе Р-70.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (Проект № 17-16-01099).

Литература

1. *Kamikawa C. M., Mendes R. P., Vicentini A. P. Standardization and validation of Dot-ELISA assay for Paracoccidioides brasiliensis antibody detection //Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. – 2017. – V. 23. – P. 11.*
2. *Feodorova V. A., Zaitsev S. S., Khizhnyakova M. A., Saltykov Y. V., Evstifeev V. V., Khusainov F. M., Yakovlev S. I., Larionova O. S., Motin V. L. Data of de novo genome assembly of the Chlamydia psittaci strain isolated from the livestock in Volga Region, Russian Federation // Data in brief. – 2020. – V.29. – P. 105190.*
3. *Fourie K. R., Wilson H. L. Understanding GroEL and DnaK stress response proteins as antigens for bacterial diseases // Vaccines (Basel). – 2020. – V. 8, N. 4. – P. 773.*

UDC 60: 619: 577

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-255-257

DETECTION OF SEROLOGICAL RESPONSE TO THE RECOMBINANT CHLAMYDIA PSITTACI PROTEIN DNAK USING DOT-ELISA TECHNIQUE

Lyapina A.M.[1], **Khizhnyakova M.A.**[1], **Kichemazova N.V.**[1], **Kolosova A.A.**[1], **Evstifeev V.V.**[2], **Larionova O.S.**[3], **Feodorova V.A.**[1*]

[1] *Federal Research Center for Virology and Microbiology (FRCViM), Branch in Saratov, Saratov, Russia 410028, Saratov, the 53rd Strelkovoy Divizii str., 6,*
[2] *Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia 420074, Kazan, Scientific Town-2*
[3] *Federal Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilova, Saratov, Russia 410012, Saratov, Teatralnaya squre, 1,*
* *e-mail: feodorovav@mail.ru*

The results of dot-ELISA application for the detection of IgG specific to the recombinant *Chlamydia psittaci* DnaK antigen in sera of farm animals vaccinated with a commercial chlamydia vaccine are presented. It was revealed, that *C. psittaci* heat shock protein DnaK participates in immune response of sheep immunized with the vaccine based on the *C. psittaci* Rostinovo-70 strain.

Key words: Dot-ELISA, DnaK, *Chlamydia psittaci*

Dot-ELISA (DE), a variant of the enzyme-linked immunosorbent assay, is a technique based on the detection of an antigen-antibody complex and visualized by the development of a color reaction of an antibody-conjugated enzyme with a chromogenic substrate. The advantages of dot-ELISA technique are rapidity and simplicity of the method, as well as the use of polymer membranes with a certain pore diameter as a solid phase, allowing the adsorption of proteins with different molecular weights [1]. *Chlamydia* infection of farm animals caused by representatives of the genus *Chlamydia* poses a serious threat to animal husbandry and public health. Previously, we have shown the presence in the genome of the vaccine strain *C. psittaci* Rostinovo-70 (R-70), which is used for the prevention of chlamydiosis of livestock animals in the Russian Federation, a recombinant insert acquired from *C. abortus* [2]. This insert encodes, among others, the heat shock protein DnaK, possessing an ability to activate the components of innate and adaptive immunity [3]. The aim of this work was to identify specific immunoglobulins to the recombinant *C. psittaci* DnaK protein in sera of livestock animals vaccinated with the vaccine strain *C. psittaci* R-70 using the DE technique. Recombinant DnaK protein was purified from endotoxin (AtaGenix Laboratories, Wuhan, China) and used as a target antigen. Inactivated bacteria of *C. psittaci* R-70 strain served as a positive control, while phosphate buffered saline (PBS) was used as a negative control. Sera were obtained from sheep (n = 8) immunized with the

vaccine strain *C. psittaci* R-70. Antigens in a volume of 1 µl were dotted on nitrocellulose membrane with 0.2 µm pore diameter (Bio-Rad Laboratories, USA) and fixed by heat in thermostat. Membranes were blocked with 1% lactalbumin in PBS with continuous shaking. Washing steps were performed with PBS containing 0.05% Tween 20 (Helicon, Russia). Specific reaction was visualized using an anti-species conjugate labeled with horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich, USA) and a water-insoluble chromogenic substrate (TMB, Sigma-Aldrich, USA).

We found, that all sera (8/8, 100%) reacted positively with inactivated bacteria of vaccine strain in the absence of interaction with negative control. Moreover, 75% (6/8) of the investigated samples were seropositive to the recombinant protein DnaK. Thus, we showed the perspectives of DE technique for detection of specific antibodies to the heat shock protein DnaK of *C. psittaci* in sera of sheep immunized against chlamydiosis. Our results may indicate a probable participation of the heat shock protein DnaK in the immune response induced by vaccination with the vaccine based on the *C. psittaci* R-70 strain.

This study was funded by the Russian Science Foundation, Project No. 17-16-01099.

References

1. *Kamikawa C. M., Mendes R. P., Vicentini A. P. Standardization and validation of Dot-ELISA assay for Paracoccidioides brasiliensis antibody detection //Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. – 2017. – V. 23. – P. 11.*
2. *Feodorova V. A., Zaitsev S. S., Khizhnyakova M. A., Saltykov Y. V., Evstifeev V. V., Khusainov F. M., Yakovlev S. I., Larionova O. S., Motin V. L. Data of de novo genome assembly of the Chlamydia psittaci strain isolated from the livestock in Volga Region, Russian Federation // Data in brief. – 2020. – V.29. – P. 105190.*
3. *Fourie K. R., Wilson H. L. Understanding GroEL and DnaK stress response proteins as antigens for bacterial diseases // Vaccines (Basel). – 2020. – V. 8, N. 4. – P. 773.*

УДК: 632.3.01/.08, ББК: 28.3 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-257-259

РАСПРОСТРАНЕНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА GRAPEVINE PINOT GRIS VIRUS В РОССИИ

Д.А.Швец, С.В.Виноградова

Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Россия, 119071 , Москва, Ленинский пр-т, 33, корп. 2, Darya-shv@mail.ru, 89035303750

Впервые в России был обнаружен вирус винограда Пино гри (Grapevine Pinot gris virus, GPGV) на виноградных насаждениях Ставропольского края и Республики Крым. Методом ПЦР в режиме реального времени установлено, что распространенность GPGV на виноградниках Краснодарского края составляет 82%, Ставропольского края – 94% и Республики Крым – 68%. Процент сходства на нуклеотидном уровне российских изолятов GPGV с ближайшим изолятом из Генбанк составил 97,5-99,5%.

Ключевые слова: GPGV, вирус, детекция, ПЦР в реальном времени

Вирус винограда Пино гри (*Grapevine Pinot gris virus*, GPGV) является представителем рода *Trichovirus*. Впервые идентифицирован в 2012 году на виноградной лозе и вызывает симптомы хлоротичной пятнистости и деформации листьев [1]. Наличие GPGV на виноградных насаждениях было зарегистрировано на европейском, азиатском, американском и австралийском континентах – в большинстве регионов выращивания винограда [2], при этом на данный момент информация о распространении GPGV в виноградарских районах России отсутствует. Учитывая экономическую важность и вредоносность заболевания, вызванного патогеном, целью данного исследования является изучение распространения и генетического разнообразия вируса винограда Пино гри (GPGV) на территории Российской Федерации.

В ходе исследования были проанализированы 1328 образцов виноградной лозы с симптомами вирусной инфекции из трех регионов России. Для детекции GPGV выделяли тотальную РНК и проводили дуплексную ОТ-ПЦР в режиме реального времени со специфичными праймерами и зондом к гену белка оболочки вируса [3] и гену шаперонина 21 хлоропластного генома винограда [4]. В результате анализа было установлено, что распространенность GPGV на виноградниках Краснодарского края составляет 82%, Ставропольского края – 94% и Республики Крым – 68%.

Для изучения генетического разнообразия изолятов GPGV амплифицировали области транспортного

белка (MP) и белка оболочки (CP) генома вируса. Полученные последовательности сравнивали с имеющимися в Генбанк последовательностями с помощью BLAST. Процент сходства на нуклеотидном уровне с ближайшим изолятом из Генбанк составил 97,5-99,5%.

Для установления филогенетических взаимоотношений проводили множественное выравнивание 42 изолятов из России и 180 мировых изолятов из Генбанк. По результатам анализа было установлено, что российские изоляты кластеризуются в отдельную группу вместе с изолятами из Италии, Словакии, Чехии, Германии, Канады, США и Венгрии.

Таким образом, в настоящем исследовании были изучены три основных зоны выращивания винограда на юге России (Краснодарский край, Республика Крым, Ставропольский край) на предмет наличия и генетической изменчивости GPGV. Впервые в России GPGV обнаружен на виноградниках Ставропольского края и Республики Крым.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 19-76-10029 с использованием оборудования ЦКП «Биоинженерия» и ЭУИК U-73547.

Литература

1. *Giampetruzzi A., Roumi V., Roberto R. et al. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris // Virus Res. 2012. Vol. 163. № 1. P. 262–268.*
2. *Hily J. M., Poulicard N., Candresse T. et al. Datamining, Genetic Diversity Analyses, and Phylogeographic Reconstructions Redefine the Worldwide Evolutionary History of Grapevine Pinot gris virus and Grapevine berry inner necrosis virus // Phytobiomes J. 2020. Vol. 4. № 2. P. 165–177.*
3. *Bianchi G. L., De Amicis F., De Sabbata L. et al. Occurrence of Grapevine Pinot gris virus in Friuli Venezia Giulia (Italy): field monitoring and virus quantification by real-time RT-PCR // EPPO Bull. 2015. Vol. 45. № 1. P. 22–32.*
4. *Angelini E., Bianchi G. L., Filippin L. et al. A new TaqMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay // J. Microbiol. Methods. 2007. Vol. 68. № 3. P. 613–622.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-257-259

OCCURRENCE AND MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF GRAPEVINE PINOT GRIS VIRUS IN RUSSIA

D.Shvets, S.Vinogradova

Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Russia, 119071 , Moscow, Leninsky Ave., 33, bld. 2

For the first time in Russia Grapevine Pinot gris virus (GPGV) was detected on the vineyards of the Stavropol Territory and the Republic of Crimea. It has been discovered by real-time PCR that the distribution of GPGV in the vineyards of the Krasnodar Territory is 82%, in the Stavropol Territory - 94% and in the Republic of Crimea - 68%. Nucleotide percentage similarity of the Russian GPGV isolates in comparison with the closest isolates from Genbank was 97,5-99,5%.

Key words: GPGV, virus, detection, real-time PCR

Grapevine Pinot gris virus (GPGV) is a member of the genus *Trichovirus*. It was first discovered on grapevine in 2012. GPGV causes leaf mottling and deformation on grapevine [1]. The presence of GPGV on vineyards was recorded on the European, Asian, American and Australian continents [2]. There is still no information about the GPGV distribution in the wine-growing regions of Russia. Considering the economic importance and harmfulness of the disease caused by this pathogen, the aim of our research is to study the distribution and genetic diversity of GPGV in the Russian Federation.

Totally 1328 samples of grapevine with symptoms of a viral infection were analysed from three regions of Russia. To detect GPGV, total RNA was isolated and duplex real-time RT-PCR was performed. To do this we used specific primers and TaqMan probes to the viral coat protein gene [3] and the grapevine chloroplast chaperonin 21 gene [4]. As a result the distribution of GPGV in the vineyards of the Krasnodar Territory is 82%, in the Stavropol Territory - 94% and in the Republic of Crimea - 68%.

To study the genetic diversity of GPGV isolates, movement protein (MP) and coat protein (CP) of the viral genome were amplified and sequenced. The obtained nucleotide sequences were compared with the sequences

available in the Genbank using the BLASTn. Nucleotide percentage similarity of the Russian GPGV isolates in comparison with the closest isolate from Genbank was 97,5-99,5%.

To establish the phylogenetic relationships, multiple sequence alignments were performed on 42 isolates from Russia and 180 isolates available in the Genbank. It was found that Russian isolates are clustered together with isolates from Italy, Slovakia, Czech Republic, Germany, Canada, USA and Hungary.

Therefore, in this study three growing areas of grapevine of the south of Russia (Krasnodar Territory, Republic of Crimea, Stavropol Territory) were surveyed for the distribution and genetic diversity of GPGV. For the first time in Russia GPGV was detected on the vineyards of the Stavropol Territory and the Republic of Crimea.

Grant: This study was supported by RSF (project No. 19-76-10029) and was performed using the scientific equipment of Core Research Facility of Center «Bioengineering» and experimental climate control facility U-73547.

References

1. *Giampetruzzi A., Roumi V., Roberto R. et al. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris // Virus Res. 2012. Vol. 163. № 1. P. 262–268.*
2. *Hily J. M., Poulicard N., Candresse T. et al. Datamining, Genetic Diversity Analyses, and Phylogeographic Reconstructions Redefine the Worldwide Evolutionary History of Grapevine Pinot gris virus and Grapevine berry inner necrosis virus // Phytobiomes J. 2020. Vol. 4. № 2. P. 165–177.*
3. *Bianchi G. L., De Amicis F., De Sabbata L. et al. Occurrence of Grapevine Pinot gris virus in Friuli Venezia Giulia (Italy): field monitoring and virus quantification by real-time RT-PCR // EPPO Bull. 2015. Vol. 45. № 1. P. 22–32.*
4. *Angelini E., Bianchi G. L., Filippin L. et al. A new TaqMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay // J. Microbiol. Methods. 2007. Vol. 68. № 3. P. 613–622.*

УДК 573.6 : 338.36 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-259-261

ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В РАЗВИТИИ РЯДА АКТУАЛЬНЫХ ОБЛАСТЕЙ БИОЭКОНОМИКИ

Шишкин С.С., Титова Е.С.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2
e-mail: sergeyshishkin@yandex.ru

Омиксные технологии создают научно-методическую базу биоэкономики и уже находят применение в различных областях индустрии от производства и контроля качества продуктов питания до обеспечения переработки различных отходов в биотопливо.

Ключевые слова: биоэкономика; геномика; протеомика; метаболомика; омиксные технологии; биоинформатика.

Достижения наук о жизни и, прежде всего, биотехнологии, создали условия для эффективного использования и переработки биологических ресурсов в целях экономического развития, что получило обобщенное название – биоэкономика. Биоэкономику рассматривают, в частности, как новую индустрию, использующую высокоэффективные технологии и накопленные знания о геномах про- и эукариот. Соответственно, принципиальный вклад в развитие биоэкономики внесли и продолжают вносить так называемые «омики» - целый набор научных дисциплин, появление, которых было связано с осуществлением проекта «Геном человека» и формированием первой из «омик» - геномики. Геномика стала использовать системный подход к изучению геномов и комплекс новых «геномных» технологий, после чего возникли протеомика, метаболомика и др. [1-3]. Общее количество «омик» по некоторым оценкам приблизилось к 200 [2], а разработанные омиксные технологии, поднявшие на новый уровень биоаналитику, стали находить применение в различных областях индустрии, в частности, в производстве и контроле качества продуктов питания (включая функциональные), лекарств, диагностических тест-систем, целого спектра биодобавок; в создании различных микроорганизмов (биопродуцентов) для обеспечения переработки пищевых и сельскохозяйственных

отходов, а также при производстве биотоплива. Результатам разработок омиксных технологий, которые вовлечены в развитие перечисленных направлений биоэкономики, посвящены сотни обзоров и многие тысяч статей, в том числе [2-5]. Перечень омиксных технологий уже весьма широк, но большинство из них обладают общими характеристиками, наряду с существенными отличиями. Во-первых, омиксные технологии обычно решают задачи на основе системных исследований. Во-вторых, часто эти технологии применяются в виде мультиплексных систем, например, масс-спектрометрия в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией. В-третьих, как правило, использование омиксных технологий осуществляется с привлечением так называемых «больших данных» («big data») и методов биоинформатики. Наконец, представляется важным отметить появление технологий нового поколения секвенирования («new generation sequencing»), которые качественно расширили возможности структурной и функциональной геномики. Таким образом, омики и омиксные технологии объективно создают научно-методическую базу биоэкономики. Ряд омиксных технологий (относящихся к функциональной геномике, протеомике и метаболомике) нашли применение в работе ФИЦ Биотехнологии РАН. С учетом того, что биоэкономика нуждается в подготовленных специалистах, способных использовать свои знания как непосредственно на производстве, так и в решении соответствующих научно-исследовательских заданий, в ФИЦ Биотехнологии РАН реализуется образовательная программа, которая содержит дисциплины, обеспечивающие знакомство с различными омиксными технологиями, благодаря чему создаются условия подготовки специалистов высокого уровня для биоэкономики [6].

Литература

1. *Примроуз С., Тваймен Р. Геномика. Роль в медицине. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. – 277 с.*
2. *Grassmann J., Scheerle R.K., Letzel T. Functional proteomics: application of mass spectrometry to the study of enzymology in complex mixtures // Anal. Bioanal. Chem. 2012. Vol. 402. № 2. P. 625-645.*
3. *Veenstra T.D. Omics in Systems Biology: Current Progress and Future Outlook // Proteomics. 2021. Vol. 21. № 3-4. P. e2000235.*
4. *Шишкин С.С. Клиническая биохимия начала постгеномной эры в биологии человека. – М.: РУДН, 2016. – 616 с.*
5. *Titova E.S. Biofuel Application as a Factor of Sustainable Development Ensuring: The Case of Russia // Energies. 2019. Vol. 12. P. 3948.*
6. *Титова Е.С., Шишкин С.С., Крицкий М.С., Камионская А.М. Цифрофизация и «-омики» – новые подходы к подготовке научных кадров // Высшее образование сегодня. – 2020. – № 10. – С. 28-33.*

UDK 573.6 : 338.36 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-259-261

OMICS TECHNOLOGIES IN THE DEVELOPMENT OF A NUMBER TOPICAL FIELDS IN BIOECONOMY

Shishkin S.S., Titova E.S.

Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119071, Moscow, Leninsky Prospect 33, bld. 2, e-mail: sergeyshishkin@yandex.ru

Omics technologies create a scientific and methodological basis for bioeconomics and are already being used in various fields of industry from food products production and quality control to ensuring the processing of various wastes into biofuels.

Keywords: bioeconomy; genomics; proteomics; metabolomics; omics technologies; bioinformatics.

The achievements of the life sciences and, above all, biotechnology, have created conditions for the effective use and processing of biological resources for economic development, which has received a generalized name – bioeconomy. Bioeconomy is considered, in particular, as a new industry that uses highly efficient technologies and accumulated knowledge about the genomes of prokaryotes and eukaryotes. Accordingly, a fundamental contribution to the bioeconomy development has been made and continues to be made by the so-called «omics» - a whole set of scientific disciplines, the emergence of which was associated with the implementation of the Human Genome project and formation of the genomics – the first of the «omics». Genomics began to use a systematic approach to the study of genomes and a complex of new «genomic» technologies, after which proteomics, metabolomics,

etc. emerged [1-3]. By some estimates, the total number of «omics» approached 200 [2], and the developed omics technologies, which raised bioanalytics to a new level, began to find application in various fields of industry, in particular, in the production and quality control of food (including functional), drugs, diagnostic test systems, a whole range of dietary supplements; in the creation of various microorganisms (bioproducers) to ensure the processing of food and agricultural waste, as well as in the biofuel production. Hundreds of reviews and many thousands of articles, including [2-5], are devoted to the omics` technologies development results involved in these areas of bioeconomy. The list of omics technologies is already very wide, but most of them have common characteristics along with significant differences. First, omics technologies usually solve problems based on system research. Secondly, these technologies are often used in the form of multiplex systems, for example, mass spectrometry in combination with high-efficient liquid chromatography. Third, as a rule, the use of omics technologies is carried out with the involvement of the so-called «big data» and methods of bioinformatics. At last, it is important to note the emergence of new generation sequencing technologies, which have qualitatively expanded the possibilities of structural and functional genomics. Thus, omics and omics technologies objectively create a scientific and methodological base of bioeconomy. A number of omics technologies (related to functional genomics, proteomics, and metabolomics) have found application in the work of the Research Center of Biotechnology RAS. Taking into account the fact that bioeconomy needs trained specialists who can use their knowledge both directly in the industry and in solving relevant research tasks, an educational program implemented at the Research Center of Biotechnology RAS, which contains disciplines that provide the knowing of various omics technologies, thanks to this, creates conditions for training high-level specialists for bioeconomy [6].

References

1. *Primrose S., Twyman R. Genomics. Role in Medicine. – M.: BINOM. Knowledge Laboratory, 2008. – 277 p.*
2. *Grassmann J., Scheerle R.K., Letzel T. Functional proteomics: application of mass spectrometry to the study of enzymology in complex mixtures // Anal. Bioanal. Chem. 2012. Vol. 402. № 2. P. 625-645.*
3. *Veenstra T.D. Omics in Systems Biology: Current Progress and Future Outlook // Proteomics. 2021. Vol. 21. № 3-4. P. e2000235.*
4. *Shishkin S.S. Clinical biochemistry of the early post-genomic era in human biology. – M.: PFUR, 2016. – 616 p.*
5. *Titova E.S. Biofuel Application as a Factor of Sustainable Development Ensuring: The Case of Russia // Energies. 2019. Vol. 12. P. 3948.*
6. *Titova E.S., Shishkin S.S., Kriczkij M.S., Kamionskaya A.M. Digitalization and 'Omics' - New Approaches to Training Scientific Personnel // Higher education today. 2020. Vol. 10. P. 28-33.*

УДК 621.015.1 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-261-263

ЭЛЕКТРОАНАЛИЗ В ПОСТГЕНОМНУЮ ЭРУ: РЕЗУЛЬТАТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Шумянцева В.В.[1,2], **Булко Т.В.**[1], **Кузиков А.В.**[1,2], **Масамрех Р.А.**[1,2], **Королева П.И.**[1],. **Агафонова Л.Е**[1], **Гилеп А.А.**[1,3], **Усанов С.А.**[3]

[1] *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича" (ИБМХ), Москва, 119121, Погодинская ул., д.10*
[2] *ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва,*
[3] *Институт биоорганической химии НАН Беларуси*
Viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Разработан метод электроанализа каталитической активности полиморфных модификаций цитохрома P450 2C9, 2C9*2 и 2C9*3. Для фармакогеномных исследований проведен анализ механизмов взаимодействия ДНК с лекарственными препаратами.

Ключевые слова: электроанализ, цитохром P450, ДНК, полиморфизм, электроокисление, лекарственные препараты, фармакогеномика

Генетический полиморфизм определяет особенности фармакокинетики лекарственных средств. Проведен сравнительный анализ каталитической активности изоморфных модификаций цитохромов P450 2C9, 2C9*2, 2C9*3. Для исследования каталитической активности цитохромов P450, высокопроизводительного скрининга потенциальных субстратов, ингибиторов, эффекторов, поиска средств-корректоров метаболической активности этого надсемейства гемопротеинов как биокатализаторов разработаны электрохимические методы анализа, основанные на использовании рекомбинантных и генетически модифицированных ферментов. Проведен обоснованный выбор сенсорных конструкций для электроанализа биомолекул и выбора тандема биомолекула/модификатор. Разработан метод коррекции каталитической активности аллельных вариантов с помощью антиоксидантных метаболических препаратов. Разработаны новые подходы для высокочувствительной регистрации каталитической активности цитохромов P450 на основе флуоресцентных и электрохимических свойств субстратов и продуктов метаболических реакций цитохромов P450. Проведен анализ электрохимических параметров для моделирования совместного применения лекарств с различной терапевтической направленностью (антибиотики, метаболические антиоксидантные препараты, ингибиторы азольной природы, нестероидные противовоспалительные препараты). Предложен метод анализа и экспериментального расчета такого электрохимического параметра как потенциал начала катализа (Eonset) для сравнительной характеристики межлекарственных взаимодействий и выявления взаимного влияния на биотрансформацию, катализируемую цитохромом P450 3A4. Была выявлена закономерность, позволяющая прогнозировать поведение субстратов в качестве «ведущего» («perpetrator» или «нарушитель» в терминах фармакокинетики), метаболизируемого цитохомом P450 3A4 в первую очередь и не подверженного влиянию второго «ведомого» субстрата («victim» или «жертвы» по терминологии фармакокинетики). Прогностическая роль электрохимических параметров подтверждена в экспериментах по анализу межлекарственных взаимодействий для эритромицина, омепразола, кортизола, тестостерона, диклофенака. Проведено исследование механизмов взаимодействия ДНК с лекарственными препаратами в различных формах (фосфолипидных композициях) для фармакогеномных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственной поддержки создания и развития Научных центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» № 75-15-2020-913.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-261-263

ELECTROANALYSIS IN POSTGENOMIC ERA: RESULTS AND PERSPECTIVES

Shumyantseva V.V.[1,2], **Bulko T.V.**[1], **Kuzikov A.V.**[1,2],
Masamrech R.A.[1,2], **Agafonova L.E.**[1], **Gilep A.A.**[1,3], **Usanov S.A.**[3]

[1] *Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya Street, 10, Moscow 119121, Russia*
[2] *Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovitianov Street, 1, Moscow 117997, Russia*
[3] *Institute of Bioorganic Chemistry, Belarus*
Viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

A method for electroanalysis of the catalytic activity of polymorphic modifications of cytochrome P450 2C9, 2C9 * 2 and 2C9 * 3 has been developed. A study of the mechanisms of interaction of DNA with drugs was carried out.

Key words: electroanalysis, cytochrome P450, DNA, polymorphism, electrooxidation, drugs, pharmacogenomics

Genetic polymorphism determines the characteristics of the pharmacokinetics of drugs. A comparative analysis of the catalytic activity of isomorphic modifications of cytochromes P450 2C9, 2C9 * 2, 2C9 * 3 was carried out. Electrochemical methods have been developed based on the use of recombinant and genetically modified enzymes for the study the catalytic activity of cytochromes P450, high-throughput screening of potential substrates, inhibitors, effectors for the metabolic activity of this superfamily of hemoproteins as biocatalysts,. A substantiated choice of sensor structures for the electroanalysis of biomolecules and the choice of a biomolecule / modifier tandem was carried out. A method for correcting the catalytic activity of allelic variants using antioxidant metabolic drugs has been developed. New approaches have been developed for highly sensitive registration of the catalytic activity of cytochromes P450 based on the fluorescent and electrochemical properties of substrates and products of metabolic reactions of cytochromes P450. The analysis of electrochemical parameters was carried out to simulate the combined use of drugs with various therapeutic action (antibiotics, metabolic antioxidant drugs, azole

inhibitors, nonsteroidal anti-inflammatory drugs). A method for the analysis and experimental calculation of such an electrochemical parameter as the potential of the onset of catalysis (Eonset) is proposed for the comparative characterization of drug-drug interactions and the identification of the mutual influence on the biotransformation catalyzed by cytochrome P450 3A4. A regularity was revealed that allows one to predict the behavior of substrates as a "master" ("perpetrator" or "intruder" in terms of pharmacokinetics) metabolized by cytochome P450 3A4 in the first place and not subject to the influence of the second "slave" substrate ("victim" in pharmacokinetic terminology). The predictive role of electrochemical parameters was confirmed in experiments on the analysis of drug-drug interactions for erythromycin, omeprazole, cortisol, testosterone, diclofenac. A study of the mechanisms of interaction of DNA with drugs in various forms (phospholipid compositions) for pharmacogenomics studies was carried out.

This work was financed by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of state support for the creation and development of World-Class Research Centers “Digital biodesign and personalized healthcare” No. 75-15-2020-913.

БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

BIOCATALYSIS AND TECHNOLOGIES

1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НА ОСНОВЕ РАЗЛИЧНЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ
В.В. Агапова, С.В. Алфёров 266

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF BIOFUEL ELEMENTS BASED ON DIFFERENT BIOCATALYSTS
V. Agapova, S. Alferov 267

2. БИОСИНТЕЗ МАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ГЛЮКОЗЫ ПО ОБРАЩЕНОМУ ПУТИ БЕТА-ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ РЕКОМБИНАТНЫМ ШТАММОМ ESCHERICHIA COLI В РЕЖИМЕ ПОЛНОКЛЕТОЧНОГО БИОКАТАЛИЗАТОРА ЗА СЧЕТ ФОРСИРОВАННОГО ГИДРОЛИЗА АТФ
Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г. 268

BIOSYNTHESIS OF BUTYRIC ACID FROM GLUCOSE THROUGH THE INVERTED FATTY ACID BETA-OXIDATION PATHWAY BY RECOMBINANT ESCHERICHIA COLI STRAIN IN BIOCATALYTIC MODE DUE TO ENFORCED ATP HYDROLYSIS
Gulevich A.Yu., Skorokhodova A.Yu., Debabov V.G. 269

3. ФЕРМЕНТЫ КАК МИШЕНИ ДЛЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И ИХ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ДЕТОКСИФИКАТОРЫ: НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА ИЗВЕСТНУЮ ПРОБЛЕМУ
Ефременко Е.Н., Асланлы А.Г., Лягин И.В. 269

ENZYMES AS TARGETS FOR THE EFFECTS OF ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS AND THEIR BIOCATALYTIC DETOXIFIERS: A NEW LOOK AT A WELL-KNOWN PROBLEM
Efremenko E.N., Aslanli A.G., Lyagin I.V. 270

4. БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СИНТЕЗА СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ. МОДУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЛИПАЗЫ ВЫБОРОМ РАСТВОРИТЕЛЯ И НОСИТЕЛЯ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ
Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Пыхтина М.Б., Беклемишев А.Б. 271

BIOCATALYTIC PROCESSES OF LOW-TEMPERATURE SYNTHESIS OF ESTERS. MODULATION OF THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF LIPASE BY THE CHOICE OF SOLVENT AND SUPPORT FOR IMMOBILIZATION
Kovalenko G.A., Perminova L.V., Pykhtina M.B., Beklemishev A.B. 272

5. БИОГИБРИДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ ПРИ РАЗРАБОТКЕ БИОФИЛЬТРОВ ДЛЯ ОЧИСТКИ МЕТАНОЛЬНЫХ СТОКОВ
Д.Г. Лаврова, О.Н. Понаморева 273

BIOHYBRID MATERIALS AS PROMISING BIOCATALYSTS IN THE DEVELOPMENT OF BIOFILTERS FOR THE METHANOL WASTEWATER TREATMENT
D. Lavrova, O. Ponamoreva 274

6. СОВРЕМЕННЫЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЗАЩИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ ПРОТИВ БИОЛОГИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ
Лягин И.В., Завьялова Н.В., Завьялов В.В., Гореленков В.К., Фролов Г.А., Степанов Н.А., Асланлы А.Г., Ефременко Е.Н. 275

MODERN BIOCATALYTIC TECHNOLOGIES FOR PROTECTIVE MATERIALS AGAINST BIOLOGICAL AND CHEMICAL AGENTS
Lyagin I.V., Zavyalova N.V., Zavyalov V.V., Gorelenkov V.K., Frolov G.A., Stepanov N.A., Aslanli A.G., Efremenko E.N. 276

7. ВВЕДЕНИЕ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ В ПРОЦЕСС ХИМИКО-БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ДЕСУЛЬФУРИЗАЦИИ НЕФТЯНЫХ ФРАКЦИЙ
Маслова О.В., Сенько О.В., Степанов Н.А., Гладченко М.А., Гайдамака С.Н., Акопян А.В., Поликарпова П.Д., Есева Е.А., Лысенко С.В., Анисимов А.В., Ефременко Е.Н. 277

INCLUSION OF BIOCATALYSTS INTO THE PROCESS OF CHEMICAL-BIOLOGICAL OXIDATIVE DESULFURIZATION OF OIL FRACTIONS
Maslova O.V., Senko O.V., Stepanov N.A., Gladchenko M.A., Gaydamaka S.N., Akopyan A.V., Polikarpova P.D., Eseva E.A., Lysenko S.V., Anisimov A.V., Efremenko E.N. 278

8. ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ С ПЕРОКСИДАЗА-ПОДОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ
Панфёров В.Г., Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. 279

HIGHLY SENSITIVE IMMUNOASSAY WITH PEROXIDASE-MIMICKING NANOPARTICLES
Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. 280

9. СМЕШАННАЯ КУЛЬТУРА МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ METHYLOPHILUS QUAYLEI И METHYLORUBRUM EXTORQUENS ПРОДУЦИРУЕТ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТ И ЭКЗОПОЛИСАХАРИД
Джулай Д.С., Митина Е.Р., Пшеничникова А.Б. 280

MIXED CULTURE OF METHYLOTROPHIC BACTERIA METHYLOPHILUS QUAYLEI AND METHYLORUBRUM EXTORQUENS PRODUCES POLY-3-HYDROXYBUTYRATE AND EXOPOLYSACCHARIDE
Dzhulay D.S., Mitina E.R., Pshenichnikova A.B. 281

10. БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В СТРОИТЕЛЬСТВЕ И ЖКХ: ПРИМЕНЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ
Пустовгар А.П. 282

BIOCATALYTIC TECHNOLOGIES IN CONSTRUCTION AND HOUSING AND COMMUNAL SERVICES: APPLICATION AND PROSPECTS
Pustovgar A.P. 283

11. МИКРОБНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ – ОСНОВА ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ
Ревин В.В., Лияськина Е.В., Пестов Н.А., Кадималиев Д.А., Долганов А.В. 284

MICROBIAL POLYSACCHARIDES – THE BASIS FOR NEW GENERATION POLYFUNCTIONAL MATERIALS
Revin V.V., Liyaskina E.V., Pestov N.A., Kadimaliev D.A., Dolganov A.B. 285

12. ФОРМИРОВАНИЕ ПОКРЫТИЙ НА ОСНОВЕ PH- И ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОГЕЛЕЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗНЫХ БИОСЕНСОРНЫХ СИСТЕМ
А.А. Шалыбкова , Т.З. Шарифуллин, Д.В. Пергушов, Л.В. Сиголаева 287

PREPARATION OF COATINGS BASED ON PH- AND THERMOSENSITIVE POLYMERIC MICROGELS FOR ENGINEERING OF GLUCOSE OXIDASE BIOSENSOR SYSTEMS
A. Shalybkova, T. Sharifullin, D. Pergushov, L. Sigolaeva 288

УДК: 579.66:579.6 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-266-267

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НА ОСНОВЕ РАЗЛИЧНЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

В.В. Агапова, С.В. Алфёров

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, Россия, 300012, Тула, пр-т Ленина, 92, agapovaweronica@yandex.ru, 89011986362

Проведена сравнительная характеристика функционирования БТЭ на основе мембранной фракции бактерий Gluconobacter oxydans используемой в виде суспензии, а также иммобилизованной в ПВС, модифицированный N-винилпирролидоном.

Ключевые слова: биотопливный элемент; мембранная фракция; микроорганизмы Gluconobacter oxydans; иммобилизация

Биологические топливные элементы можно разделить на две группы по типу используемых биокатализаторов: ферментные топливные элементы и микробные топливные элементы. Движущая сила ФТЭ – это окислительно-восстановительные реакции используемого субстрата, которые катализируются ферментом. Данные системы достаточно стабильны в работе и обладают высокой производительностью. Микробные топливные элементы обладают устойчивостью к внешним факторам, но показывают менее воспроизводимые результаты.

Одним из важных этапов в проектировании БТЭ является выбор биокатализатора. Перспективным направлением является использование в БТЭ мембранной фракции уксуснокислых бактерий *Gluconobacter oxydans*. Целью данной работы явилась сравнительная оценка энергетических характеристик биотопливного элемента при использовании различных типов биокатализатора, иммобилизованного в поливиниловый спирт (ПВС), модифицированный N-винилпирролидоном.

Были собраны макеты БТЭ на основе мембранной фракции *G.oxydans*, иммобилизованной в поливиниловый спирт, а также в виде суспензии, при использовании медиатора гексацианоферрата (III) калия (ГЦФ) и без него в катодном пространстве. В качестве субстрата биоокисления служил раствор глюкозы. Оценку энергетических характеристик проводили на внешнем сопротивлении в диапазоне от 200 кОм до 0,47 кОм. Типичный вид зависимости расчетного значения мощности от внешнего сопротивления представлен на рис.1.

Рис. 1. График зависимости мощности от внешнего сопротивления

Полученные значения энергетических характеристик для всех макетов БТЭ приведены в таблице 1. При использовании ГЦФ энергетические характеристики выше, чем без использования медиатора в катодном пространстве.

Таблица 1. Сравнительная оценка энергетических характеристик БТЭ с мембранной фракцией бактерий *G. oxydans*

В ходе работы установлено, что при использовании иммобилизованной мембранной фракции бактерий G. oxydans генерируемый потенциал на 80% выше, чем при использовании биокатализатора в виде суспензии. Присутствие ГЦФ в катодном пространстве позволяет в 1,5 раза увеличить генерируемый потенциал, а также снизить внутреннее сопротивление ячейки. Мощность модели БТЭ значительно увеличивается. Из полученных результатов можно сделать вывод, что оптимальной конфигурацией анода для биотопливного элемента является биоанод с иммобилизованной мембранной фракцией бактерий G.oxydans, а присутствие ГЦФ существенно повышает производительность итогового БТЭ.

В ходе работы установлено, что при использовании иммобилизованной мембранной фракции бактерий *G. oxydans* генерируемый потенциал на 80% выше, чем при использовании биокатализатора в виде суспензии. Присутствие ГЦФ в катодном пространстве позволяет в 1,5 раза увеличить генерируемый потенциал, а также снизить внутреннее сопротивление ячейки. Мощность модели БТЭ значительно увеличивается. Из полученных результатов можно сделать вывод, что оптимальной конфигурацией анода для биотопливного элемента является биоанод с иммобилизованной мембранной фракцией бактерий *G.oxydans*, а присутствие ГЦФ существенно повышает производительность итогового БТЭ.

Финансирование: Исследование выполнено в рамках проекта по Государственному заданию МИНОБРНАУКИ (№ FEWG-2020-0008).

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-266-267

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF BIOFUEL ELEMENTS BASED ON DIFFERENT BIOCATALYSTS

V.Agapova, S.Alferov

Tula State University, Russia, 300012, Tula, Prospect Lenina, 92

Comparative characteristics of the of BFC based on the membrane fraction of bacteria Gluconobacter oxydans used in the form of a suspension, as well as immobilized in PVA modified with N-vinylpyrrolidone ware carried out.

Key words: biofuel element; membrane fraction; microorganisms Gluconobacter oxydans; immobilization

Biological fuel cells (BFC) can be divided into two groups according to the type of the used biocatalysts: enzymatic fuel cells and microbial fuel cells. The driving force of the enzymatic BFC is the redox reactions of the substrate, which are catalyzed by an enzyme. These systems are quite stable and have higher performance. Microbial fuel cells are resistant to external factors, but show less reproducible results.

One of the important stages in the design of BFC is the selection of a biocatalyst. A promising direction is the use of the membrane fraction (MF) of the acetic acid bacteria *Gluconobacter oxydans* in BFC. The goal of this work was a comparative assessment of the energy characteristics of a BFC using various types of biocatalyst immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) modified with N-vinylpyrrolidone.

Models of BFC were setup based on the *G. oxydans* membrane fraction immobilized in polyvinyl alcohol, as well as in the form of a suspension, with the use of potassium hexacyanoferrate (III) mediator (PHCF) and without it in the cathode chamber. A glucose solution was used as a substrate for biooxidation. The evaluation of the energy characteristics was carried out at an external resistance in the range from 200 kOhm to 0.47 kOhm. A typical dependence of the calculated power value on the external resistance is shown on the image 1.

Drawing 1. Graph of power versus external resistance

The obtained values of the energy characteristics for all BFC models are shown in Table 1. When using PHCF, the energy characteristics was significantly higher than without using mediator in the cathode chamber.

Table 1. Comparative assessment of the energy characteristics of BFC with the membrane fraction of bacteria *G. oxydans*

In the course of the work, it was found that using an immobilized membrane fraction of bacteria *G. oxydans*, the generated potential is increased up to 80% compared with suspension of the MF. The presence of HCP in the cathode chamber makes it possible to increase the generated potential by 1.5 times, as well as to reduce the internal resistance of the biofuel cell. From the results obtained, it can be concluded that the optimal anode configuration for a biofuel cell under discussion is a bioanode with an immobilized membrane fraction of G. oxydans bacterial cells, and the presence of PHCF in the anode chamber significantly increases the power output of BFC.

In the course of the work, it was found that using an immobilized membrane fraction of bacteria G. oxydans, the generated potential is increased up to 80% compared with suspension of the MF. The presence of HCP in the cathode chamber makes it possible to increase the generated potential by 1.5 times, as well as to reduce the internal resistance of the biofuel cell. From the results obtained, it can be concluded that the optimal anode configuration for a biofuel cell under discussion is a bioanode with an immobilized membrane fraction of *G. oxydans* bacterial cells, and the presence of PHCF in the anode chamber significantly increases the power output of BFC.

This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of a state assignmentin the field of scientific activity project No FEWG-2020-0008.

УДК 577.121 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-268-269

БИОСИНТЕЗ МАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ГЛЮКОЗЫ ПО ОБРАЩЕНОМУ ПУТИ БЕТА-ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ РЕКОМБИНАТНЫМ ШТАММОМ ESCHERICHIA COLI В РЕЖИМЕ ПОЛНОКЛЕТОЧНОГО БИОКАТАЛИЗАТОРА ЗА СЧЕТ ФОРСИРОВАННОГО ГИДРОЛИЗА АТФ

Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г.

ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия,
117312, Москва, пр-т 60-летия Октября д. 7, корп.1;
e-mail: andrey.gulevich@gmail.com

Показана применимость форсированного гидролиза АТФ для обеспечения анаэробного функционирования штамма *Escherichia coli*, продуцента масляной кислоты по обращенному пути бета-окисления жирных кислот, в режиме полноклеточного биокатализатора

Ключевые слова: бета-окисление жирных кислот, *Escherichia coli*, метаболическая инженерия, полноклеточный биокатализатор

Конструирование рекомбинатных штаммов *E. coli*, продуцентов промышленно-значимых восстановленных соединений, традиционно включает инактивацию путей брожения, конкурирующих с биосинтезом целевых веществ за восстановленные эквиваленты. В результате, соответствующие рекомбинанты не способны к анаэробному росту и в отсутствие аэрации потенциально могут функционировать, как полноклеточные биокатализаторы, конвертирующие углеродный субстрат в продукт без формирования биомассы. Препятствием для реализации подобного функционала у рекомбинантов служит избыточная для нерастущей культуры генерация АТФ, обуславливающая торможение гликолиза и ограничивающая, тем самым, утилизацию субстратов, перспективных для микробной биотехнологии. Актуальным подходом решения данной проблемы является форсированный гидролиз АТФ.

Обращенное бета-окисление жирных кислот (БОЖК) является гибкой биохимической платформой для синтеза широкого спектра востребованных промышленностью восстановленных химикатов. В настоящей работе исследована возможность использования форсированного гидролиза АТФ для обеспечения анаэробного функционирования штамма, способного к синтезу масляной кислоты из глюкозы по обращенному бета-окислению жирных кислот, в режиме полноклеточного биокатализатора. В качестве базового использован штамм BOX-3 Δ4 P_L-*atoB* P_L-*tesB* Δ*yciA* (MG1655 *lacI*^{Q} P_L-SD_{phi10}-*atoB*, $P_{trc\text{-ideal-4}}$-SD_{phi10}-*fadB*, $P_{trc\text{-ideal-4}}$-SD_{phi10}-*fadE*, P_L-SD_{phi10}-*tesB*, Δ*ackA-pta*, Δ*poxB*, Δ*ldhA*, Δ*adhE*, Δ*yciA*). Данный рекомбинант синтезировал масляную кислоту из глюкозы анаэробно с выходом, достигающим лишь 0,35 моль/моль. Форсированный гидролиз АТФ был обеспечен в штамме при активации цитоплазматической АТФазы за счет делеции генов *atpFH*, разобщающей F_0 и F_1 компоненты клеточной АТФсинтазы, а также за счет обеспечения функциональности футильного цикла фосфоенолпируват-пируват, в результате оверэкспрессии гена фосфоенолпируватсинтазы *ppsA*. Полученные производные базового штамма были способны к анаэробному потреблению глюкозы нерастущей культурой, возросшему в 1,5 раза, демонстрируя выход целевого продукта, достигающий 0,55 моль/моль. При этом, достижение теоретических значений выхода лимитировалось, по-видимому, лишь экспрессией к рекомбинантах хромосомальных копий целевых генов. Полученные данные экспериментально подтверждают перспективность обеспечения форсированного гидролиза в рекомбинантных штаммах *E. coli*, продуцентов промышленных химикатов, для придания им свойств анаэробных полноклеточных биокатализаторов.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект №18-29-08059).

UDC 577.121 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-268-269

BIOSYNTHESIS OF BUTYRIC ACID FROM GLUCOSE THROUGH THE INVERTED FATTY ACID BETA-OXIDATION PATHWAY BY RECOMBINANT ESCHERICHIA COLI STRAIN IN BIOCATALYTIC MODE DUE TO ENFORCED ATP HYDROLYSIS

Gulevich A.Yu., Skorokhodova A.Yu., Debabov V.G.

Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences», Moscow, Russia
117312, Moscow, 60 let Oktjabrja pr-t, 7, bld. 1
e-mail: andrey.gulevich@gmail.com

The feasibility of the application of enforced ATP hydrolysis to ensure anaerobic functioning of *Escherichia coli* strain producing butyric acid through the inverted fatty acid beta-oxidation pathway as a full-cell biocatalyst has been demonstrated.

Key words: fatty acid beta-oxidation, *Escherichia coli*, metabolic engineering, whole-cell biocatalyst

Engineering of recombinant *E. coli* strains producing industrially valuable reduced chemicals traditionally implies inactivation of fermentation pathways competing with the biosynthesis of the target compounds for the reducing power. As the result, the respective recombinants are incapable of anaerobic growth and, then, may function anoxically as whole-cell biocatalysts converting carbon substrate to target product without biomass formation. An obstacle to the implementation of such a functional in recombinants is the generation of ATP excessive for a non-growing culture that leads to the inhibition of glycolysis and thereby restricts the utilization of substrates promising for microbial biotechnology. An enforced ATP hydrolysis is an actual approach to overcome this problem.

Inverted fatty acid beta-oxidation (BOX) is a flexible biochemical platform for the synthesis of a wide array of valuable reduced chemicals. In the current study the feasibility of the application of enforced ATP hydrolysis to ensure anaerobic functioning of the strain capable of synthesising butyric acid from glucose through the inverted fatty acid beta-oxidation pathway as a full-cell biocatalyst has been evaluated. Previously engineered Escherichia coli strain BOX-3 Δ4 P_L-*atoB* P_L-*tesB* Δ*yciA* (MG1655 *lacI*^{Q} P_L-SD_{phi10}-*atoB*, $P_{trc\text{-ideal-4}}$-SD_{phi10}-*fadB*, $P_{trc\text{-ideal-4}}$-SD_{phi10}-*fadE*, P_L-SD_{phi10}-*tesB*, Δ*ackA-pta*, Δ*poxB*, Δ*ldhA*, Δ*adhE*, Δ*yciA*) was used as the core strain. The respective recombinant synthesised butyric acid from glucose with a yield reaching only 0.35 mol/mol. Enforced ATP hydrolysis was ensured in the strain upon activation of cytoplasmatic ATPase due to deletion of *atpFH* genes causing uncoupling of F_0 and F_1 components of cellular ATP synthase, and, also, resulting from the activation of the futile cycle of pyruvate-phosphoenolpyruvate by the overexpression of phosphoenolpyruvate synthase gene, *ppsA*. The resulting derivatives of the core strain were capable of anaerobic utilisation of glucose increased up to 1.5 times. The achievement of theoretical yield values was apparently limited, apparently, only by the expression in the recombinants of individual chromosomal copies of the target genes. The obtained data experimentally confirm the potential of enforcement of ATP hydrolysis in recombinant E. coli strains, producers of industrial chemicals, to allow their functioning as anaerobic full-cell biocatalysts.

Funding: The work was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research (project #18-29-08059).

УДК 623.459::577.15::517.15 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-269-271

ФЕРМЕНТЫ КАК МИШЕНИ ДЛЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И ИХ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ДЕТОКСИФИКАТОРЫ: НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА ИЗВЕСТНУЮ ПРОБЛЕМУ

Ефременко Е.Н., Асланлы А.Г., Лягин И.В.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия
elena_efremenko@list.ru

Проведенные исследования позволили выявить новые мишени в виде важнейших декарбоксилаз для возможного негативного воздействия известных фосфорорганических соединений и оценить их потенциальную опасность для человека.

Ключевые слова: пестициды, фософорганические соединения, декарбоксилазы, молекулярный докинг, биокатализ

Чаще всего в качестве основных мишеней для токсичного воздействия фософрорганических соединений (ФОС) в организме человека рассматриваются ацетилхолинэстераза (АХЭ) и целый ряд других ферментов, однако наше внимание привлек тот факт, что в этом ряду оказались не отмечены декарбоксилазы - ферменты, относящиеся к классу лигаз, осуществляющих декарбоксилирование аминокислот, бета-кетокислот и альфа-кетокислот. При этом известно, что продуктами каталитических реакций наиболее значимых декарбоксилаз являются нейромедиаторы различных процессов в организме человека, играющих важнейшую роль особенно в функционировании центральной нервной системы. Сбои в функционировании этих ферментов приводят к возникновению дефицита или избытка соответствующих нейромедиаторов, что, в свою очередь, может приводить к развитию серьезных нейродегенеративных патологий. Методы молекулярного моделирования (метод докинга и молекулярной динамики) были применены с целью получения моделей взаимодействий разных декарбоксилаз в апо- и холоформе с ФОС (пестицидов и отравляющих веществ) в сравнении с аналогичными моделями взаимодействия тех же ферментов с их специфичными субстратами и ингибиторами. Установлено, что молекулы ФОС способны связываться с декарбоксилазами независимо от того, находятся ли они в apo- or holo-форме, при этом конкурируя как с молекулой кофактора (перидоксальфосфата), с субстратами этих ферментов, так и с молекулами известных ингибиторов данных ферментов. Неожиданно, но ФОС, малотоксичные по отношению к АХЭ, проявили себя как потенциально крайне опасные токсины во взаимодействии с декарбоксилазами.

Выполнено в рамках госфинансирования по теме АААА-А21-121011290089-4 и при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды».

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-269-271

ENZYMES AS TARGETS FOR THE EFFECTS OF ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS AND THEIR BIOCATALYTIC DETOXIFIERS: A NEW LOOK AT A WELL-KNOWN PROBLEM

Efremenko E.N., Aslanli A.G., Lyagin I.V.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
e-mail: elena_efremenko@list.ru

The conducted studies made it possible to identify new targets in the form of the most important decarboxylases for the possible negative effects of known organophosphorus compounds and to assess their potential danger to humans.

Key words: pesticides, organophosphate compounds, decarboxylases, molecular docking, biocatalysis

Most often, acetylcholinesterase (AChE) and a number of other enzymes are considered as the main targets for the toxic effects of organophosphate compounds (OPC) in the human body, but our attention was drawn to the fact that decarboxylases - enzymes belonging to the class of ligases that decarboxylate amino acids, beta-keto acids and alpha-keto acids were not noted in this series. At the same time, it is known that the products of the catalytic reactions of the most significant decarboxylases are neurotransmitters of various processes in the human body, which play an important role especially in the functioning of the central nervous system. Failures in the functioning of these enzymes lead to a deficiency or excess of the corresponding neurotransmitters, which, in turn, can lead to the development of serious neurodegenerative pathologies. The methods of molecular modeling (the method of docking and molecular dynamics) were used to obtain models of the interactions of different decarboxylases in the apo-and holo-form with OPC (pesticides and toxic substances) in comparison with similar models of the interaction of the same enzymes with their specific substrates and inhibitors. It has been established that OPC molecules are able to bind to decarboxylases regardless of whether they are in apo-or holo-form, while competing with both

the cofactor molecule (peridoxalphosphate), with the substrates of these enzymes, and with molecules of known inhibitors of these enzymes. Unexpectedly, OPC, which are low-toxic in relation to AChE, showed themselves as potentially extremely dangerous toxins in interaction with decarboxylases.

This research was funded by State Task of Lomonosov Moscow State University (AAAA-A21-121011290089-4). This research was performed according to the Development program of the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Lomonosov Moscow State University "The future of the planet and global environmental change".

УДК 577.154.2 + 542.952+ 579.22; 577.152.1 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-271-273

БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СИНТЕЗА СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ. МОДУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЛИПАЗЫ ВЫБОРОМ РАСТВОРИТЕЛЯ И НОСИТЕЛЯ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ

Коваленко Г.А.[1,3], **Перминова Л.В.**[1], **Пыхтина М.Б.**[2], **Беклемишев А.Б.**[1,2]

[1] *Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск, Россия*
630090, Новосибирск, пр. Акад. Лаврентьева, 5
[2] *Научно-исследовательский институт биохимии СО РАН, Новосибирск, Россия*
630117 Новосибирск, ул. Тимакова, 2
[3] *Новосибирский государственный Университет, Новосибирск, Россия*
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2
e-mail: galina@catalysis.ru

Биокаталитические процессы синтеза ценных продуктов, таких как сложные эфиров разного состава и назначения, изучены с использованием гетерогенных биокатализаторов, приготовленных иммобилизацией рекомбинантной липазы r*Pichia*/lip на мезопористом силикагеле (SiO_2) и макропористом углеродном аэрогеле (МУА). Обнаружено, что свойства иммобилизованной липазы, такие как ферментативная активность, специфичность по отношению к паре субстратов (кислоте и спирту), молекулы которых различаются количеством атомов углерода (С), а также операционная стабильность, зависят от способа адсорбционной иммобилизации, химической природы носителя, полярности органического растворителя, или logP. Показано, что функциональные свойства r*Pichia*/lip модулируются путем выбора органического растворителя и носителя для иммобилизации липазы r*Pichia*/lip.

Ключевые слова: биокаталитическая этерификация, рекомбинантная липаза r*Pichia*/lip, иммобилизация, мезопористый силикагель, макропористый углеродный аэрогель, синтез эфиров

Сложные эфиры востребованы на рынке и обладают высокой коммерческой ценностью в различных областях промышленности, включая косметическую, парфюмерную, пищевую отрасли, в которых эти продукты применяют в качестве душистых вещества, отдушек, эмоллиентов, поверхностно-активных веществ.

Биокатализаторы для низкотемпературного синтеза сложных эфиров были приготовлены путем адсорбционной иммобилизации рекомбинантной липазы rPichia/lip на мезопористом силикагеле (SiO_2) [1] и макропористом углеродном аэрогеле (МУА) [2, 3]. Синтез сложных эфиров проводили в периодическом режиме в неводных средах органических растворителей, различающихся полярностью, или величиной logP. Были составлены матрицы 9×9 относительной активности, характеризующие специфичность иммобилизованной r*Pichia*/lip к парам субстратов с различной длиной углеродного скелета, а именно, насыщенным жирным кислот С4–С18 и алифатическим *n*-спиртам С2–С16.

Было показано, что скорость синтеза сложных эфиров определяется природой растворителя, используемого для приготовления реакционной среды. Максимальная этерифицирующая активность биокатализаторов, полученных адсорбцией r*Pichia*/lip на углеродном аэрогеле, наблюдалась в гексане (logP=6.8) и толуоле (logP=2.5). В среде полярных растворителей, таких как хлороформ (logP=2.0) и ацетон (logP=0.38) активность падала на 1–2 порядка. Исследование полярных со-растворителей, добавляемых в неполярный гексан для увеличения растворимости субстратов/продуктов реакции, показало, что диэтиловый эфир (logP=0.70) является оптимальным со-растворителем, поскольку биокатализаторы обладали не

только сравнительно высокой активностью, но и максимальной операционной стабильностью. Так, конверсия кислоты составила 90±5 % за 4 часа в реакции синтеза эфиров (например, бутил гептаноата) при 20±2°С. Биокатализаторы полностью сохраняли ферментативную активность в течение 6–10 реакционных циклов.

Было обнаружено, что функциональные свойства приготовленных биокатализаторов модулировались выбором носителя для иммобилизации липазы. Этерифицирующая активность биокатализаторов, приготовленных адсорбцией r*Pichia*/lip на SiO_2, была на порядок ниже, чем при адсорбции липазы на углеродном аэрогеле [1,2]. Приготовленные биокатализаторы различались и специфичностью биокатализа. Так, r*Pichia*/lip на гидрофобном МУА эффективно синтезировала душистые этиловые эфиры короткоцепочечных С4–С8 кислот, тогда как r*Pichia*/lip на гидрофильном SiO_2 – эфиры гидрофобных длинноцепочечных С12–С18 кислот.

Литература

1. *Kovalenko G.A., Perminova L.V., Beklemishev A.B. Catalytic properties of recombinant Thermomyces lanuginosus lipase immobilized by impregnation into mesoporous silica in the enzymatic esterification of saturated fatty acids with aliphatic alcohols // Reac Kinet Mech Cat. 2019. 128 (1), 479–491.*
2. *Kovalenko G.A., Perminova L.V., Beklemishev A.B. Heterogeneous biocatalytical esterification by recombinant Thermomyces lanuginosus lipase immobilized on macroporous carbon aerogel // Catalysis Today. 2020. DOI: 10.1016/j.cattod.2020.11.018.*
3. *Коваленко Г.А., Перминова Л.В. Гетерогенные биокаталитические процессы низкотемпературного синтеза сложных эфиров: выбор органического растворителя // Катализ в промышленности. 2020. Т. 20. № 4. С. 313–322.*

УДК 577.154.2 + 542.952+ 579.22; 577.152.1 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-271-273

BIOCATALYTIC PROCESSES OF LOW-TEMPERATURE SYNTHESIS OF ESTERS. MODULATION OF THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF LIPASE BY THE CHOICE OF SOLVENT AND SUPPORT FOR IMMOBILIZATION

Kovalenko G.A.[1,3], **Perminova L.V.**[1], **Pykhtina M.B.**[2], **Beklemishev A.B.**[1,2]

[1] *Boreskov Institute of Catalysis, Novosibirsk, Russia*
630090, Novosibirsk, Av. Akad. Lavrentyeva, 5
[2] *Research Institute of Biochemistry, Novosibirsk, Russia*
630117, Novosibirsk, Timakova str., 2
[3] *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia,*
630090, Novosibirsk, Pirogova str., 2
e-mail: galina@catalysis.ru

Biocatalytic processes for the synthesis of valuable products, such as different esters for various purposes, have been studied using heterogeneous biocatalysts prepared by immobilizing the recombinant lipase r*Pichia*/lip on mesoporous silica (SiO_2) and macroporous carbon aerogel (MCA). It was found that the functional properties of immobilized lipase, such as enzymatic activity, specificity toward pair of substrates (acid and alcohol), the molecules of which differ in the number of carbon atoms (C), as well as operational stability, depended on the method of adsorptive immobilization, the chemical nature of the support, and polarity of the organic solvent, i.e. logP. The functional properties of r*Pichia*/lip have been shown to be modulated by the selection of an organic solvent and support for lipase immobilization.

Key words: biocatalytic esterification, recombinant lipase r*Pichia*/lip, immobilization, mesoporous silica, macroporous carbon aerogel, esters' synthesis

Esters are in demand on the market and have high commercial value in various industrial areas, including cosmetics, perfumery, food industries, in which these products are used as fragrances, odors, emollients, surfactants.

Biocatalysts for low-temperature synthesis of esters were prepared by adsorptive immobilization of the

recombinant lipase r*Pichia*/lip on mesoporous silica (SiO_2) [1] and macroporous carbon aerogel (MCA) [2, 3]. The synthesis of esters was carried out in batch sealed reactors in non-aqueous media of organic solvents differing in polarity, i.e. logP value. Matrices 9×9 of relative activities were compiled, characterizing the specificity of immobilized r*Pichia*/lip toward pairs of substrates with different lengths of the carbon skeleton, namely, saturated fatty acids C4–C18 and aliphatic n-alcohols C2–C16.

It was found that the rate of esterification was determined by the nature of the organic solvent. The maximum esterifying activity of biocatalysts prepared by adsorption of r*Pichia*/lip on carbon aerogel, was observed in non-polar hexane (logP=6.8) and toluene (logP=2.5). In polar solvents such as chloroform (logP=2.0) and acetone (logP=0.38), the biocatalytic activity decreased by 1–2 orders of magnitude. Polar co-solvents were added into non-polar hexane to increase solubility of substrates and products. It was found that diethyl ether (logP=0.70) was an optimal co-solvent, since the prepared biocatalysts had not only high enzymatic activity, but also maximum operational stability. As a result, the conversion of acid was 90 ± 5% for 4 hours of the esters' synthesis (for example, butyl heptanoate) at 20 ± 2oC. Biocatalysts completely retained their activity for 6–10 reaction cycles.

It was found that the functional properties of the biocatalysts were modulated by the choice of an appropriate support for lipase immobilization. The esterifying activity of biocatalysts prepared by the adsorption of r*Pichia*/lip on hydrophilic SiO_2 was an order of magnitude lower than for lipase adsorbed on hydrophobic carbon aerogel [1, 2]. The prepared biocatalysts differed in the specificity of biocatalysis as well. It was found that r*Pichia*/lip adsorbed on carbon aerogel efficiently synthesized pleasant-smelling odorous ethyl esters of short-chain fatty C4–C8 acids, while lipase immobilized on hydrophilic SiO_2 carried out synthesis of esters of hydrophobic long-chain C12–C18 acids comparatively better.

References

1. *Kovalenko G.A., Perminova L.V., Beklemishev A.B. Catalytic properties of recombinant Thermomyces lanuginosus lipase immobilized by impregnation into mesoporous silica in the enzymatic esterification of saturated fatty acids with aliphatic alcohols // Reac Kinet Mech Cat. 2019. 128 (1), 479–491.*
2. *Kovalenko G.A., Perminova L.V., Beklemishev A.B. Heterogeneous biocatalytic esterification by recombinant Thermomyces lanuginosus lipase immobilized on macroporous carbon aerogel // Catalysis Today. 2020. DOI: 10.1016/j.cattod.2020.11.018.*
3. *Kovalenko G.A., Perminova L.V. Heterogeneous biocatalytic processes of the low-temperature synthesis of esters: selecting an organic solvent // Catalysis in Industry. 2021. Vol. 13. No. 1. P. 90–98.*

УДК: 579.6:695:663 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-273-275

БИОГИБРИДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ ПРИ РАЗРАБОТКЕ БИОФИЛЬТРОВ ДЛЯ ОЧИСТКИ МЕТАНОЛЬНЫХ СТОКОВ

Д.Г. Лаврова, О.Н. Понаморева

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тульский государственный университет», Россия, 300012, Тула, Пр. Ленина, 92, d.g.fedoseeva@gmail.com, 89539531492

Для иммобилизации микроорганизмов использовали одностадийный путь золь-гель синтеза матриц из тетраэтоксисилана (ТЭОС) и метилтриэтоксисилана (МТЭС) в присутствии гидрофильных полимеров. Инкапсулированные микроорганизмы применили при разработке биофильтра с естественной и принудительной аэрацией для очистки метанолсодержащих стоков.

Ключевые слова: инкапсулированные микроорганизмы, «клетка в ормосил оболочке», биогибридные материалы, золь-гель, кремнийорганические соединения, биофильтр

Для очистки сточных вод промышленных предприятий применяют биологические методы с использованием живых микроорганизмов для удаления остаточных вредных загрязнений. Использование иммобилизованных микроорганизмов в этих процессах имеют ряд преимуществ по сравнению со свободными клетками [1,2]. Последнее десятилетие интенсивно разрабатываются методы получения «живых» гибридных материалов (далее - биогибридных материалов, биогибридов), в которых клетки покрыты искусственными оболочками, обеспечивающими им защиту от механического, химического и биологического воздействий окружающей среды. Для создания биогибридных материалов на основе соединений кремния,

которые являются подобием диатомовых водорослей, применяют мягкие методы золь-гель химии. Добавление гидрофильных полимеров (полиэтиленгликоля - ПЭГ, поливинилового спирта - ПВС) может привести к улучшению биосовместимость, например, путем улучшение поверхностных взаимодействий между кремневой матрицей и живой клеткой или защита клеток от стрессов инкапсуляции. Ранее мы выяснили, что в ходе иммобилизации дрожжей в условиях золь-гель синтеза при использовании ПЭГ происходит направленное формирование защитных органосиликатных оболочек вокруг клеток [3].

В работе исследовали возможность использования метилотрофных дрожжей для утилизации метанола на лабораторной модели капельного биофильтра колоночного типа. Способность лабораторного биофильтра утилизировать метанол в модельном стоке исследовали в двух режимах (с естественной и принудительной аэрацией) при скорости пропускания модельного стока 0,5 мл/мин (0,96 л/час*лзагрузки).

Показано, что при использовании биофильтров степень очистки метанольных стоков в условиях естественной аэрации составила 17±1 %, а условиях принудительной аэрации 58±3 (с ПЭГ) и 50±2 % (с ПВС) [4]. Следует отметить, что в контрольном фильтре, в котором в качестве загрузочного материала использовали органосиликатный материал с ПЭГ без микроорганизмов, сорбция метанола составила не более 6% от исходного содержания метанола, что доказывает участие в утилизации метанола именно биокатализатора - инкапсулированных метилотрофных дрожжей. Таким образом, биогибридные материалы на основе инкапсулированных микроорганизмов в органосиликатную матрицу (МТЭС, ТЭОС и ПЭГ или ПВС) являются эффективными биокатализаторами при разработке биофильтров.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания в области научной деятельности (проект № FEWG-2020-0008).

Литература

1. *Berillo D., Al-Jwaid A., Caplin J. Polymeric materials used for immobilisation of bacteria for the bioremediation of contaminants in water // Polymers. 2021. Vol. 13. № 7.*
2. *Mehrotra T. et al. Use of Immobilized Bacteria for Environmental Bioremediation: A Review // J. Environ. Chem. 2021. P. 105920.*
3. *Ponamoreva O.N. et al. Yeast-based self-organized hybrid bio-silica sol–gels for the design of biosensors // Biosens. Bioelectron. 2015. Vol. 67. P. 321–326.*
4. *Lavrova D.G. et al. Impact of hydrophilic polymers in organosilica matrices on structure, stability, and biocatalytic activity of immobilized methylotrophic yeast used as biofilter bed // Enzyme Microb. Technol. 2021. Vol. 150. P. 109879.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-273-275

BIOHYBRID MATERIALS AS PROMISING BIOCATALYSTS IN THE DEVELOPMENT OF BIOFILTERS FOR THE METHANOL WASTEWATER TREATMENT

D. Lavrova, O. Ponamoreva

Tula state university, Russia, 300012, Tula, pr.Lenina,92, pr.Lenina,92

Yeast cells were immobilized in a matrix made of tetraethoxysilane (TEOS) and methyltriethoxysilane (MTES) by one-step sol-gel route of synthesis in the presence of polyethylene glycol (PEG) or polyvinyl alcohol (PVA). . A trickling biofilter with and without active aeration was designed using entrapped yeast cells to treat methanol polluted wastewater.

Key words: encapsulated microorganisms, «cell in ormosil shell», biohybrid materials, sol–gel, organosilane compounds, biofilter

Industrial plants apply living cell-based biological methods to clean wastewater from trace pollutants. Using immobilized microorganisms for this purpose has a number of advantages compared to planktonic cells [1,2]. Methods to synthesis living hybrid materials (biohybrid materials or biohybrids) with cells covered by synthetic shells protecting them against negative mechanical, chemical, and biological impacts of the environment have been vastly developed for the past decade. Soft sol-gel chemistry is applied to receive biohybrids on based silicon compounds and which imitate natural single-cell organisms (diatoms). Additives of hydrophilic polymers

(polyethylene glycol -PEG, polyvinyl alcohol -PVA) may improve biocompatibility by, e.g. improving the surface interactions between sol-gel matrix and living cell or protecting the cells from stresses of encapsulation. In previous work, we found that the addition of PEG for yeast immobilization creates protecting organosilica shells directly around cells [3].

Methylotrophic yeast capacity to remove methanol from wastewater was investigated using a bench-scale model of a trickling biofilter column. The bench-scale biofilter capacity to remove methanol from a model wastewater sample was investigated in two modes (with and without active aeration) at a flow rate of 0,5 ml/min (0,96 l/h*lfilter bed).

Methanol wastewater treatment efficiency was at 17±1% for biofilter in natural aeration conditions and 58 ± 3% and 50 ± 2% for PEG and PVA biofilters respectively, in active aeration conditions [4]. A maximum 6% of the methanol input was removed by the reference filter with microorganism-free PEG organosilica bed proves the role of the biocatalyst, i.e., encapsulated methylotrophic yeast, in methanol removal. So, we conclude that biohybrid materials based on yeast cells encapsulated in organosilica matrices (MTES, TEOS and PEG or PVA) can be applied as an effective biofilter biocatalyst.

Grant: This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of a state assignment in the field of scientific activity (project No. FEWG-2020-0008).

References

1. *Berillo D., Al-Jwaid A., Caplin J. Polymeric materials used for immobilisation of bacteria for the bioremediation of contaminants in water // Polymers. 2021. Vol. 13. № 7.*
2. *Mehrotra T. et al. Use of Immobilized Bacteria for Environmental Bioremediation: A Review // J. Environ. Chem. 2021. P. 105920.*
3. *Ponamoreva O.N. et al. Yeast-based self-organized hybrid bio-silica sol–gels for the design of biosensors // Biosens. Bioelectron. 2015. Vol. 67. P. 321–326.*
4. *Lavrova D.G. et al. Impact of hydrophilic polymers in organosilica matrices on structure, stability, and biocatalytic activity of immobilized methylotrophic yeast used as biofilter bed // Enzyme Microb. Technol. 2021. Vol. 150. P. 109879.*

УДК [577.15+620.3]::628.5:613.63 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-275-276

СОВРЕМЕННЫЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЗАЩИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ ПРОТИВ БИОЛОГИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

Лягин И.В., Завьялова Н.В., Завьялов В.В., Гореленков В.К., Фролов Г.А., Степанов Н.А., Асланлы А.Г., Ефременко Е.Н.

МГУ имени М.В.Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия
119991, г.Москва, Ленинские горы, д.1, строение 11
E-mail: elena_efremenko@list.ru

Проведен анализ современных инновационных подходов, которые могут быть применены для получения универсальных защитных материалов широкого спектра действия.

Ключевые слова: защитный материал; наноматериал; биокатализатор; органофосфатгидролаза.

Опасные биологические и химические агенты представляют угрозу не только жизни и здоровью отдельных людей, но и, как показывают недавние события, экономике в целом. Неспособность традиционных методов и материалов, применяемых для целей предотвращения поражения этими агентами, наглядно продемонстрировали жизненную необходимость к скорейшему переходу и внедрению в жизнь последних инноваций из области нанобиотехнологий.

В данной работе представлено современное состояние разработок защитных материалов против биологических и химических агентов. Основное внимание уделено комбинированным системам, совмещающих в себе различные наноматериалы (в том числе, наночастицы, нанотрубки, металл-органические каркасные структуры, и т.д.) и биокатализаторы (прежде всего – ферменты – гидролазы и оксидазы). Именно

такое комбинирование позволяет создавать высокоэффективные универсальные защитные материалы, способные к самодетоксификации и самоочищению. Ключевую роль при этом играет разнородность в механизмах действия наноматериалов и биокатализаторов, например, на одни и те же клетки микроорганизмов.

Максимальным потенциалом обладают те наноматериалы и/или биокатализаторы, которые проявляют свою активность как в отношении биологических, так и химических агентов (например, как в случае фермента органофосфатгидролазы).

Работа выполнена в рамках государственного задания «Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды» (АААА-А21-121011290089-4) и Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета "Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды". Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-29-17069).

UDC [577.15+620.3]::628.5:613.63 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-275-276

MODERN BIOCATALYTIC TECHNOLOGIES FOR PROTECTIVE MATERIALS AGAINST BIOLOGICAL AND CHEMICAL AGENTS

Lyagin I.V., Zavyalova N.V., Zavyalov V.V., Gorelenkov V.K., Frolov G.A., Stepanov N.A., Aslanli A.G., Efremenko E.N.

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Moscow, Russia
119991, Moscow, Lenin Hills, 1, building 11
E-mail: elena_efremenko@list.ru

Modern innovative approaches which can be applied to obtain universal protective materials with a wide spectrum of action are analyzed.

Key words: protective material; nanomaterial; biocatalyst; organophosphorus hydrolase.

Hazardous biological and chemical agents pose a threat not only to the life and health of individuals, but, as recent events show, to the economy as a whole. The inability of traditional methods and materials used to prevent exposure by these agents has clearly demonstrated the vital need for an early transition and implementation of the latest innovations from the nanobiotechnology.

This work presents the state of the art in the development of protective materials against biological and chemical agents. The main attention is paid to combined systems that unite various nanomaterials (including nanoparticles, nanotubes, metal-organic frameworks, etc.) and biocatalysts (primarily enzymes – hydrolases and oxidases). Exactly such combinations allow to create highly effective universal protective materials capable of self-detoxification and self-cleaning. The key role in this is played by the diversity in the mechanisms of action of nanomaterials and biocatalysts, for example, acting on the same cells of microorganisms.

The highest potential is possessed by those nanomaterials and/or biocatalysts that are active against both biological and chemical agents (for example, as in the case of organophosphorus hydrolase).

This research was performed according to the state task "Molecular design, structural and functional analysis and regulation of enzyme systems, cell structures, bionanomaterials: fundamental principles and applications in technology, medicine, environmental protection" (AAAA-A21-121011290089-4) and Development program of the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Lomonosov Moscow State University "The future of the planet and global environmental change". The work was financed by RFBR (grant 18-29-17069).

УДК 66.012; 579.66 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-277-279

ВВЕДЕНИЕ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ В ПРОЦЕСС ХИМИКО-БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ДЕСУЛЬФУРИЗАЦИИ НЕФТЯНЫХ ФРАКЦИЙ

Маслова О.В., Сенько О.В., Степанов Н.А., Гладченко М.А., Гайдамака С.Н., Акопян А.В., Поликарпова П.Д., Есева Е.А., Лысенко С.В., Анисимов А.В., Ефременко Е.Н.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия
olga.maslova.rabota@gmail.com

Предложен, скомбинирован и апробирован ряд подходов, обеспечивающих наиболее эффективное введение биокатализаторов в процесс химико-биокаталитической десульфуризации жидкого углеводородного сырья: отбор и использование экологичных реагентов, формирование иммобилизованных искусственных консорциумов, их предварительная адаптация к средам, регулирование pH среды, введение ко-субстратов в виде с/х отходов и др.

Ключевые слова: гетерогенный катализатор; биокатализатор; иммобилизованный консорциум; десульфуризация

В связи с нарастанием экологических проблем особенно востребованными и актуальными являются ресурсосберегающие зеленые технологии, связанные с добычей, глубокой очисткой и переработкой нефтепродуктов, остающихся сегодня основным источником топлива и сырьем для химической промышленности. По сравнению с физико-химическими подходами известные аэробные и анаэробные биокаталитические процессы десульфуризации характеризуются низкими показателями скорости извлечения серы из исходного очищаемого сырья. В этой связи в рамках новых разрабатываемых процессов достижению максимальной экоэффективности (экологической и экономической) может способствовать сочетание биокаталитических и химических стадий. Из-за ингибирующего эффекта хим. реагентов эффективно совмещать в одном реакторе биологические и химические каталитические процессы удается редко. Однако, на примере модельных сред на основе сульфонов тиофена и бензотиофена, а также серосодержащих экстрактов из разных нефтяных фракций была показана возможность введения биокатализаторов в трёхстадийный процесс комбинированной химико-биологического десульфуризации жидкого углеводородного сырья на стадии биотрансформации экстрактов с окисленными серосодержащими соединениями с целью получения сульфида и биогаза [1-3].

Установлено, что наиболее эффективное введение биокатализаторов в гибридные химические процессы десульфуризации возможно с учетом особенностей биологических объектов и при комбинировании ряда предложенных и апробированных подходов. На стадиях химического окисления и экстракции были отобраны экологичные химические катализаторы и реагенты с минимальной токсичностью и максимальной эффективностью с точки зрения скорости и степени извлечения серы из очищаемого сырья: пероксид водорода, муравьиная кислота, этанол или диметилформамид, Na_2MoO_4. С учетом возможного состава серосодержащего экстракта успешным, с точки зрения достижения глубокой биотрансформации экстрактов, оказалось проведение предварительной адаптации клеток к тому или иному компоненту среды, а также варьирование состава биокаталитического консорциума путем включения в него таких компонентов, как анаэробный ил, *Desulfovibrio vulgaris, Clostridium acetobutilycum, Rhodococcus erythropolis* и др. В ходе биотрансформации серосодержащих экстрактов было продемонстрировано многократное успешное использование биокатализаторов в виде консорциумов клеток, иммобилизованных методом включения в криогель поливинилового спирта. Положительный эффект на выход биогаза с содержанием метана ~ 76% и неорганического сульфида, накапливающегося в жидкой и твердой фракциях, оказывало поддержание pH реакционной среды близким к 7,2, и введение ко-субстратов в виде различных отходов (с/х отходов, биомассы микроводорослей с очистных сооружений и др.).

Выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант 18-29-05064).

Литература

1. *Senko O., Maslova O., Gladchenko M., Gaydamaka S., Akopyan A., Lysenko S., Karakhanov E., Efremenko E. Prospective approach to the anaerobic bioconversion of benzo-and dibenzothiophene sulfones to sulfide // Molecules. – 2019. – V. 24. – №. 9. – P. 1736.*
2. *Senko O., Maslova O., Gladchenko M., Gaydamaka S., Efremenko E. Biogas production from biomass of microalgae chlorella vulgaris in the presence of benzothiophene sulfone // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. — 2019. — Vol. 525. — P. 012089.*

3. Maslova O. , Senko O. , Stepanov N. et al. Formation and use of anaerobic consortia for the biotransformation of sulfur-containing extracts from pre-oxidized crude oil and oil fractions // Bioresource Technology. — 2021. — Vol. 319. — P. 124248.

UDC 66.012; 579.66 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-277-279

INCLUSION OF BIOCATALYSTS INTO THE PROCESS OF CHEMICAL-BIOLOGICAL OXIDATIVE DESULFURIZATION OF OIL FRACTIONS

Maslova O.V., Senko O.V., Stepanov N.A., Gladchenko M.A., Gaydamaka S.N., Akopyan A.V., Polikarpova P.D., Eseva E.A., Lysenko S.V., Anisimov A.V., Efremenko E.N.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
e-mail: olga.maslova.rabota@gmail.com

A number of approaches are proposed, combined and tested to ensure the most effective introduction of biocatalysts into the process of chemical and biocatalytic desulfurization of liquid hydrocarbon raw materials: selection and use of environmentally friendly reagents, formation of immobilized artificial consortia, their preliminary adaptation to media, pH control of the medium, introduction of co-substrates in the form of agricultural waste, etc.

Key words: heterogeneous catalysis; biocatalyst; immobilized consortium; desulfurization

Currently, due to the growing environmental problems, resource-saving green technologies are particularly in demand and relevant. Including those related to the extraction, deep cleaning and processing of petroleum products, which today remain the main source of fuel and raw materials for the chemical industry. In comparison with physico-chemical approaches, the known aerobic and anaerobic biocatalytic desulfurization processes are characterized by low rates of sulfur extraction from the initial purified raw materials. In this regard, a combination of biocatalytic and chemical stages can contribute to achieving maximum eco-efficiency (ecology and economic) within the framework of new processes being developed. Due to the inhibitory effect of chemical reagents, it is rarely possible to effectively combine biological and chemical catalytic processes in one reactor. However, using the examples of model media based on thiophene and benzothiophene sulfones, as well as sulfur-containing extracts from different oil fractions, the possibility of introducing biocatalysts into a three-stage process of combined chemical-biological desulfurization of liquid hydrocarbon raw materials was shown. Sulfide and biogas were obtained at the stage of biotransformation of extracts containing oxidized sulfur-containing compounds [1-3].

It is established that the most effective introduction of biocatalysts into hybrid chemical desulfurization processes is possible taking into account the characteristics of biological objects and by combining a number of proposed and tested approaches. At the stages of chemical oxidation and extraction, eco-friendly chemical catalysts and reagents with minimal toxicity and maximum efficiency were selected in terms of the rate and degree of sulfur extraction from the raw materials being cleaned: hydrogen peroxide, formic acid, ethanol or dimethylformamide, Na_2MoO_4. Deep biotransformation of extracts were obtained taking into account the possible composition of the sulfur-containing extract, the preliminary adaptation of cells to a particular component of the medium, as well as the variation of the composition of the biocatalytic consortium by including such components as anaerobic sludge, *Desulfovibrio vulgaris, Clostridium acetobutilycum, Rhodococcus erythropolis*, etc. During the biotransformation of sulfur-containing extracts the repeated successful use of biocatalysts in the form of consortia of cells immobilized in the cryogel of poly(vinyl alcohol) was demonstrated. A positive effect on the yield of biogas with a methane content of ~76% and inorganic sulfide accumulating in liquid and solid fractions was provided by maintaining the pH of the reaction media close to 7.2, and the introduction of co-substrates in the form of various wastes (agricultural waste, microalgae biomass, etc.).

This work was supported by the Russian Foundation of Basic Research (18-29-05064).

References

1. Senko O., Maslova O., Gladchenko M., Gaydamaka S., Akopyan A., Lysenko S., Karakhanov E., Efremenko E. Prospective approach to the anaerobic bioconversion of benzo-and dibenzothiophene sulfones to sulfide // Molecules. – 2019. – V. 24. – №. 9. – P. 1736.
2. Senko O., Maslova O., Gladchenko M., Gaydamaka S., Efremenko E. Biogas production from biomass of microalgae chlorella vulgaris in the presence of benzothiophene sulfone // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. — 2019. — Vol. 525. — P. 012089.

3. Maslova O. , Senko O. , Stepanov N. et al. Formation and use of anaerobic consortia for the biotransformation of sulfur-containing extracts from pre-oxidized crude oil and oil fractions // Bioresource Technology. — 2021. — Vol. 319. — P. 124248.

УДК 543.94 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-279-280

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ С ПЕРОКСИДАЗА-ПОДОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Панфёров В.Г., Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119071, Москва, Ленинский проспек, 33.
e-mail: panferov@vg@mail.ru

Синтезированы би- (Au@Ag), и три- (Au@Ag-Pt) металлические наночастицы, обладающие пероксидаза-подобной активностью. Наночастицы использованы в иммунохроматографическом анализе фитопатогенов и воспалительных биомаркеров. Благодаря уникальным оптическим и каталитическим свойствам наночастиц достигнуты низкие пределы обнаружения.

Ключевые слова: нанозимы; пероксидаза-подобная активность; иммунохроматография; высокочувствительный анализ.

Наночастицы с пероксидаза-подобной активностью (нанозимы) являются мультифункциональным инструментом для биоаналитических систем. Нанозимы выступают в качестве носителя аффинных рецепторов, оптической метки, а также позволяют амплифицировать колориметрический сигнал благодаря своим каталитическим свойствам. Нами изучено использование нанозимов в качестве метки для иммунохроматографического анализа (ИХА). ИХА активно используется для детекции различных веществ во внелабораторных условиях, однако его применение ограничивает высокий предел обнаружения. В ходе работы показаны конкурентные преимущества нанозимов по сравнению с традиционными наноразмерными маркерами.

Проведенный синтез биметаллических нанозимов (Au@Pt) был основан на формировании платиновой оболочки вокруг золотых наночастиц. Исследовано влияние концентрации прекурсора платины на морфологию частиц, их оптические и каталитические свойства. Синтез три-металлических нанозимов (Au@Ag-Pt) включал формирование серебряной оболочки вокруг золотых наночастиц и последующее гальваническое замещение серебра ионами $PtCl_6^{2-}$. Этот подход приводит к депонированию каталитически активных атомов Pt исключительно на поверхности частиц с увеличением относительной пероксидазной активности до 20 раз по сравнению с биметаллическими нанозимами. Проведена характеристика оптических свойств триметаллических нанозимов, установлены условия синтеза, позволяющие варьировать максимум адсорбции от 400 до 600 нм.

Установлено влияние концентрации прекурсоров на каталитические свойства нанозимов, получена серия нанозимов со значениями Km 50–500 мМ (субстрат пероксид водорода), 0,06-4 мМ (субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин). Специфическая активность (ед/мг) нанозимов варьировалась от 0,06 до 13,1. Показано, что би- и триметаллические нанозимы сохраняют пероксидаза-подобную активность в концентрированном пероксиде водорода (до 5 М) и при высоких температурах. Высокая стабильность позволяет специфично регистрировать пероксидаза-подобную активность нанозимов на фоне природных пероксидаз в растительных экстрактах и сыворотке крови.

Были получены конъюгаты би/три-металлических нанозимов с антителами, разработаны системы ИХА фитопатогенов (*Clavibacter michiganensis*, X вирус картофеля) и воспалительного маркера (С-реактивный белок). Тест-системы апробированы на растительных экстрактах, сыворотке и цельной капиллярной крови. Снижение предела обнаружения ИХА достигалось за счет каталитической реакции окисления субстрата (3,3-диаминобензидина) в присутствии пероксида водорода, проводимой непосредственно на тест-полоске. В результате достигнуто существенное, до 500 раз, снижение пределов обнаружения. Предложенный подход является экспрессным (3-5 минут) и может быть реализован во внелабораторных условиях.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 19-14-00370.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-279-280

HIGHLY SENSITIVE IMMUNOASSAY WITH PEROXIDASE-MIMICKING NANOPARTICLES

Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.

The Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences
119071, Moscow, Leninsky prospect, 33
e-mail: panferov@vg@mail.ru

Bi (Au@Ag)-and trimetallic (Au@Ag-Pt) nanoparticles with peroxidase-mimicking activity were synthesized. The nanoparticles were used for lateral flow immunoassay of phytopathogens and inflammatory biomarker. Low values of the limit of detection were achieved thanks to the unique optical and catalytic properties of the nanoparticles.

Key words: nanozymes, peroxidase-mimicking activity, lateral flow immunoassay, highly sensitive assay.

Nanoparticles possessing peroxidase-mimicking activity (nanozymes) are multifunctional tools for bioanalytical systems. Nanozymes act as carriers of affine receptors, optical labels and amplify a colorimetric signal using their catalytic properties. We used nanozymes as the label for lateral flow immunoassay (LFIA). LFIA is widely used for the detection of various compounds in non-laboratory analysis. However, a high limit of detection limits the applicability of LFIA. We showed the benefits of nanozymes as the labels in comparison with conventional nano-sized labels.

Synthesis of bimetallic nanozymes (Au@Pt) is based on the formation of Pt-shell around gold nanoparticles. We studied the effects of platinum precursor's concentration on the particles' morphology, optical and catalytic properties. Synthesis of trimetallic nanozymes (Au@Ag-Pt) included the formation of silver shell around gold nanoparticles and subsequent galvanic replacement of Ah with $PtCl_6^{2-}$. This approach facilitates the accumulation of catalytic-active Pt atoms exclusively on the nanoparticles' surface and results in 20-times higher peroxidase-mimicking activity than bimetallic nanoparticles. We characterized the optical properties of trimetallic nanozymes and determined the conditions for the manipulation of the absorbance wavelength within the range of 400-600 nm.

The influence of precursors' concentration on catalytic properties of nanozymes was determined. The nanozymes with Km within the range of 50-500 mM (hydrogen peroxide as a substrate) and 0.06 – 4 mM (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as a substrate) were synthesized. The specific activity (units per mg) of nanozymes was within the range of 0.06 – 13.1. Bi-and trimetallic nanozymes maintain peroxidase-mimicking activity in the concentrated hydrogen peroxide (up to 5 M) and elevated temperatures. High stability facilitates the specific detection of peroxidase-mimicking activity of nanozymes even in the background of natural peroxidases in plant extracts and serum.

Conjugates of bi-and trimetallic nanozymes with antibodies were synthesized and used for LFIA of phytopathogens (*Clavibacter michiganensis*, potato virus X) and inflammatory biomarker (C-reactive protein). The developed test systems were validated on plant extracts, serum, and capillary whole blood. The reduction of the limit of detection of LFIA was achieved by catalytic oxidation reaction of the substrate (3, 3' diaminobenzidine and hydrogen peroxide) on a test strip. A significant reduction of the limit of detection (500-times) was achieved. The developed approach is rapid (3-5 min) and applicable for non-laboratory use.

This study was financially supported by the Russian Science Foundation (grant number No 19-14-00370)

579.262+579.66 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-280-282

СМЕШАННАЯ КУЛЬТУРА МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ METHYLOPHILUS QUAYLEI И METHYLORUBRUM EXTORQUENS ПРОДУЦИРУЕТ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТ И ЭКЗОПОЛИСАХАРИД

Джулай Д.С., Митина Е.Р., Пшеничникова А.Б.

МИРЭА - Российский технологический университет, Москва, Россия
119454, г. Москва, Проспект Вернадского, д. 78
e-mail: a_pshenichnikova@mail.ru

Оптимизированы условия совместного культивирования аэробных метилотрофных бактерий *Methylophilus quaylei* и *Methylorubrum extorquens* и контроля содержания отдельных штаммов в консорциуме. Показано, что продукция экзополисахарида и поли-3-гидроксибутирата в смешанной культуре близки к продукции их чистыми культурами *M. quaylei* и *M. extorquens* соответственно.

Ключевые слова: метилотрофные бактерии, смешанная культура, экзополисахариды, поли-3-гидроксибутират.

Биоразлагаемый термопластичный биополимер поли-3-гидроксибутират (ПГБ) и его сополимеры накапливаются в биомассе многих бактерий, в том числе розовоокрашенных факультативных метилотрофных бактерий (РОФМ). Получение и использование ПГБ в качестве альтернативы синтетическим пластикам полиэтилену и полипропилену сдерживается более высокими ценами, которые определяются во многом стоимостью субстрата – источника углерода. С целью снижения себестоимости ПГБ в качестве субстратов используют отходы различных производств и сточные воды, и для более полной утилизации субстратов - смешанные культуры бактерий.

В настоящей работе был предложен состав консорциума метилотрофных бактерий, включающий штаммы РОФМ бактерии *M. extorquens* LP (ВКПМ В-13995) и облигатной метилотрофной бактерии *M. quaylei* MT (ВКМ В-2338^{T}), а также подобраны условия их совместного культивирования в минеральной питательной среде с метанолом (0,5% об.) при 28°С и pH 7,0. В чистых культурах облигатная метилотрофная бактерия *M. quaylei* MT продуцирует высокомолекулярный экзополисахарид (ЭПС), а штамм *M. extorquens* LP накапливает ПГБ до 30% от сухой биомассы.

В качестве инокулята использовали смесь 24-х часовой культуры *M. quaylei* MT и 48-ми часовой культуры *M. extorquens* LP в соотношении 1:1 по объему, всего 2,5% об. *M. quaylei* MT образует на агаризованной среде колонии молочно-белого цвета, а *M. extorquens* LP – розовые, что позволило определить в смешанных культурах значения колониеобразующих единиц (КОЕ) каждого отдельного штамма - сразу после добавления инокулята КОЕ/мл *M. quaylei* MT и *M. extorquens* LP составило $16{,}9\times10^{6}$ и $13{,}5\times10^{6}$ соответственно. В культуральной жидкости определяли содержание экзополисахарида (ЭПС) фенол-сернокислотным методом, а в биомассе - ПГБ кротоновым методом. Содержание ПГБ в биомассе через 48 часов культивирования достигает 16,0%, что очень близко к накоплению ПГБ чистой культурой *M. extorquens* LP (18,4%). А с учетом вклада в клеточную массу *M. quaylei* MT, не накапливающего ПГБ, продуктивность *M. extorquens* LP в смешанной культуре может быть выше, чем в чистой. Интересно, что содержание ПГБ в смешанной культуре через 120 часов культивирования значительно понижается (7,9%) в отличие от чистой культуры *M. extorquens* LP (27,6%). Концентрация ЭПС в смешанной культуре через 48 часов достигает 0,86 г/л, что близко к продуктивности по ЭПС чистой культуры *M. quaylei* MT. Важно отметить, что включение продуцента ЭПС M. quaylei стабилизирует смешанную культуру, тогда как в чистой культуре *M. extorquens* имеет склонность к агрегации.

579.262+579.66 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-280-282

MIXED CULTURE OF METHYLOTROPHIC BACTERIA METHYLOPHILUS QUAYLEI AND METHYLORUBRUM EXTORQUENS PRODUCES POLY-3-HYDROXYBUTYRATE AND EXOPOLYSACCHARIDE

Dzhulay D.S., Mitina E.R., Pshenichnikova A.B.

«MIREA – Russian Technological University», Moscow, Russia
119454, Moscow, Vernadsky avenue, 78
e-mail: a_pshenichnikova@mail.ru

The conditions for cocultivation of aerobic methylotrophic bacteria *Methylophilus quaylei* and *Methylorubrum extorquens* and control of the content of individual strains in the consortium were optimized. It was shown that the production of exopolysaccharide and poly-3-hydroxybutyrate in a mixed culture is close to their production by pure cultures of *M. quaylei* and *M. extorquens*, respectively.

Key words: methylotrophic bacteria, mixed culture, exopolysaccharides, poly-3-hydroxybutyrate.

The biodegradable thermoplastic biopolymer poly-3-hydroxybutyrate (PHB) and its copolymers accumulate in the biomass of bacteria, including pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFM). The production and

use of PHB as an alternative to synthetic plastics polyethylene and polypropylene is limited by higher cost, which largely depends on the cost of the carbon substrate. To reduce the cost of PHB, wastes from various industries and wastewater are used as substrates, and for more complete utilization of substrates are used mixed cultures of bacteria.

In this work, was proposed the composition of a consortium of methylotrophic bacteria, including strains of the PPFM *M. extorquens* LP (VKPM B-13995) and the obligate methylotrophic bacterium *M. quaylei* MT (VKM B-2338T), as well as the conditions for their cocultivation in a mineral medium with methanol (0.5 % vol.) at 28°C and pH 7.0. In pure cultures, the obligate methylotrophic bacterium *M. quaylei* MT produces a high molecular weight exopolysaccharide (EPS), while the *M. extorquens* LP strain accumulates PHB up to 30% of the dry cell weight.

The mixture of a 24-hour culture of *M. quaylei* MT and a 48-hour culture of *M. extorquens* LP in the ratio of 1:1 v/v was used as an inoculum. The total inoculum volume was 2.5 % v/v. *M. quaylei* MT forms milky-white colonies on solid medium, and *M. extorquens* LP - pink ones, which make it possible to determine the colony-forming units (CFU) of each strain in mixed cultures. Immediately after adding the inoculum, the value of CFU/ml for *M. quaylei* MT and *M. extorquens* LP was 16.9×10^6 and 13.5×10^6, respectively. The content of exopolysaccharide (EPS) in the culture broth was determined by the phenol-sulfuric acid method, and the PHB content in the biomass was determined by the crotonic assay. The PHB content in the biomass after 48 hours of cultivation was 16.0 %, which is very close to the PHB accumulation in pure culture *M. extorquens* LP (18.4 %). Taking into account the contribution of *M. quaylei* MT which does not accumulate PHB to the cell weight, the productivity of *M. extorquens* LP in a mixed culture can be higher than in a pure one. Interestingly, the content of PHB in a mixed culture after 120 hours of cultivation is reduced (7.9 %) in contrast to the pure culture of *M. extorquens* LP (27.6 %). The EPS concentration in the mixed culture after 48 hours reaches 0.86 g/l, which is close to the EPS productivity of the pure culture of *M. quaylei* MT. It is important to note that the inclusion of the EPS producer *M. quaylei* stabilizes the mixed culture, while in the pure culture *M. extorquens* tends to aggregate.

УДК 666.972.16 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-282-284

БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В СТРОИТЕЛЬСТВЕ И ЖКХ: ПРИМЕНЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Пустовгар А.П.

НИУ Московский государственный строительный университет, Москва, Россия
129337, Москва, Ярославское шоссе д.26
e-mail: nsm.mgsu@mail.ru

Рассмотрено применение биокаталитических технологий в строительстве и ЖКХ. Особое внимание уделено использованию микробиологических процессов для модификациигрунтовых оснований, бетонов и строительных растворов. Рассматриваются проблемы и направления будущих исследований в этой области.

Ключевые слова: Биоцементация, микробиологически индуцированное карбонатное осаждение, карбонат кальция, многолетнемерзлые грунты, добавки для бетонов.

Биокаталитические технологии уже сейчас находят применение в строительстве и ЖКХ, в частности при очистке сточных води ремедиации грунтов при строительстве на техногенно-загрязненных территориях [1], а так же, в составах самозалечивающихся бетонов [2]. Потенциальные преимущества биокаталитических технологий по сравнению с традиционными технологиями очистки включают: более широкий спектр удаляемых материалов, возможность очистки в широком диапазоне концентраций загрязняющих веществ, а также эффективную работу при различных значениях pH, температуры и засоленности воды и грунтов. Особый интерес представляют биокаталитические технологиии позволяющие изменять физико-механические характеристики строительных материалов и грунтовых оснований [3,4]. В докладе рассматриваются подходы к применению биокаталитических технологий для модификации грунтовых оснований, бетонов и строительных растворов. Показаны экологические преимущества биотехнологий, по сравнению с методами химической или цементной модификации грунтовых оснований. Отмечены перспективы применения биокаталитических технологий модификации грунтовых оснований, сложенных многолетнемерзлыми грунтами[5]. На примере реологических добавок рассмотрена возможность применения биокаталитических технологий для производства модифицирующих добавок для бетонов, строительных растворов, сухих строительных смесей и лакокрасочных материалов, приведены результаты лабораторных исследований технологических свойств

самоуплотняющихся бетонов (СУБ) стабилизированных водными гелями на основе различных биополимеров, получены зависимости растекаемости, водоотделения и расслаиваемости СУБ от содержания биополимера. Рассматриваются проблемы и перспективные направления будущих исследований в этой области.

Литература

1. *Kumar Pandey,Vivek K. Gaur,AswathyUdayan,SunitaVarjani, et all, Biocatalytic remediation of industrial pollutants for environmental sustainability: Research needs and opportunities//Chemosphere, vol 272, June 2021, 129936*
2. *W. De Muynck, N. De Belie, W. Verstraete, Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review// Ecol. Eng., 36 (2010), pp. 118-136*
3. *LiangCheng, RalfCord-Ruwisch, In situ soil cementation with ureolytic bacteria by surface percolation// Ecological Engeineering, Vol. 42, May 2012, pp. 64-72*
4. *J.T. DeJong, M.B. Fritzges, K. Nusslein.Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear// ASCE J. Geotech. Geoenviron. Eng., 132 (11) (2006), pp. 1381-1392*
5. *Yanyu Song, Chao Liu, Changchun Song, et all, Linking soil organic carbon mineralization with soil microbial and substrate properties under warming in permafrost peatlands of Northeastern China//CATENA, Vol.3 (2021)*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-282-284

BIOCATALYTIC TECHNOLOGIES IN CONSTRUCTION AND HOUSING AND COMMUNAL SERVICES: APPLICATION AND PROSPECTS

Pustovgar A.P.

Moscow State University of Civil Engineering, Moscow, Russia
26 Yaroslavskoe shosse, Moscow, 129337
e-mail: nsm.mgsu@mail.ru

This paper describes the use of biocatalytic technologies in construction and housing and communal services. Special attention is paid to the use of microbiological processes for the modification of soil bases, concretes and building mortars. The problems and directions of future research in this area are considered.

Keywords: Biocementation, Microbially induced carbonate precipitation (MICP), Calcium carbonate, additives for concrete, permafrost soils.

Biocatalytic technologies are already being used in construction and housing and communal services, in particular in wastewater treatment and soil remediation during construction on technogenically polluted territories [1], as well as in self-healing concrete compositions [2]. Potential advantages of biocatalytic technologies in comparison with traditional cleaning technologies include: a wider range of materials to be removed, the possibility of cleaning in a wide range of concentrations of pollutants, as well as efficient operation at various pH values, temperature and salinity of water and soil. Of particular interest are biocatalytic technologies that allow changing the physical and mechanical characteristics of building materials and soil bases [3,4]. The report discusses approaches to the application of biocatalytic technologies for the modification of soil bases, concretes and building mortars. The ecological advantages of biotechnologies in comparison with the methods of chemical or cement modification of soil bases are shown. The prospects for the application of biocatalytic technologies for the modification of soil bases composed of permafrost soils are noted [5]. Using the example of rheological additives, the possibility of using biocatalytic technologies for the production of modifying additives for concrete, building mortars, dry building mixes and paint materials is considered, the results of laboratory studies of the technological properties of self-compacting concrete (SCC) stabilized with water gels based on various biopolymers are presented, the dependences of the spreadability, water separation and delamination of the SCC on the content of the biopolymer are obtained. The problems and promising directions of future research in this area are considered.

References

1. *Kumar Pandey, Vivek K. Gaur, Aswathy Udayan, Sunita Varjani, et all, Biocatalytic remediation of industrial pollutants for environmental sustainability: Research needs and opportunities//Chemosphere, vol 272, June 2021, 129936*
2. *W. De Muynck, N. De Belie, W. Verstraete, Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review// Ecol. Eng., 36 (2010), pp. 118-136*

3. Liang Cheng, Ralf Cord-Ruwisch, In situ soil cementation with ureolytic bacteria by surface percolation// Ecological Engeineering, Vol. 42, May 2012, pp. 64-72
4. J.T. DeJong, M.B. Fritzges, K. Nusslein. Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear//ASCE J. Geotech. Geoenviron. Eng., 132 (11) (2006), pp. 1381-1392
5. Yanyu Song, Chao Liu, Changchun Song, et all, Linking soil organic carbon mineralization with soil microbial and substrate properties under warming in permafrost peatlands of Northeastern China// CATENA, Vol.3 (2021)

УДК 604.2:547.458; 674.812.2. DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-284-286

МИКРОБНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ – ОСНОВА ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Ревин В.В., Лияськина Е.В., Пестов Н.А., Кадималиев Д.А., Долганов А.В.

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Россия, 430005, Саранск, ул. Большевистская, д. 68
e-mail: revinvv2010@yandex.ru

Получены полифункциональные материалы нового поколения на основе таких микробных полисахаридов как бактериальная целлюлоза, альгинат, ксантан, хитозан. Показана возможность их применения в качестве материалов с антибактериальными, регенерационными и гемостатическими свойствами, сверхнизкой теплопроводностью, плотностью, высокими шумопоглощающими и сорбционными свойствами.

Ключевые слова: микробные полисахариды, биокомпозиционные материалы, бактериальная целлюлоза, альгинат, ксантан, леван, хитозан

В настоящее время наблюдается стремительный рост научных исследований, посвященных микробным полисахаридам, которые благодаря уникальным свойствам имеют огромные перспективы использования в качестве основы полифункциональных материалов нового поколения [1]. На кафедре биотехнологии, биоинженерии и биохимии Национального исследовательского Мордовского государственного университета в течение длительного времени проводятся исследования в области микробных полисахаридов. Получены высокопродуктивные штаммы бактерий *Xanthomonas campestris* – продуценты ксантана [2,3], *Komagataeibacter sucrofermentans* и *Komagataeibacter hansenii* – продуценты бактериальной целлюлозы [4 – 6], *Paenibacillus polymyxa* – продуцент левана [7,8]. Проведено их полногеномное секвенирование. Разработаны технологии производства бактериальной целлюлозы, ксантана, левана, альгината с использованием дешевых отходов биотехнологических производств [8 – 11]. Разработаны биокомпозиционные материалы медицинского назначения с антибактериальными, регенерационными и гемостатическими свойствами на основе бактериальной целлюлозы в форме аэрогелей, гидрогелей и пленочных форм [12 – 15]. Отработаны условия иммобилизации ферментов пепсина и β-галактозидазы на модифицированные пленки БЦ [16]. Получены биоразлагаемые хитозан-желатиновые пленки, сшитые различными микробными трансглутаминазами [17]. Получены новые материалы в виде аэрогелей на основе целлюлозы, обладающие сверхнизкой теплопроводностью, плотностью, высокими шумопоглощающими свойствами и сорбционными способностями [15, 18 – 20]. Получен новый биокомпозиционный материал с высокой сорбционной способностью по отношению к ионам фтора (80,1 мг / г) на основе бактериальной целлюлозы и химически иммобилизованных на ее поверхности атомно-слоевым осаждением наноразмерных пленок оксида алюминия [21]. Изучены структура, физико-химические и физико-механические свойства полученных материалов методами ИК-, ЯМР-спектроскопии, сканирующей электронной микроскопии, рентгено-структурного анализа и т. д.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (грант FZRS-2020-0003).

Литература

1. Ревин В.В., Лияськина Е.В. Биотехнология бактериальных экзополисахаридов : учеб. пособие. Саранск : Изд-во Мордов. ун-та, 2019. 192 с.
2. Патент РФ № 2714638.18.02.2020.
3. Revin V. V., Liyas'kina E.V., Pokidko B.V., Pimenov N.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Characteristics of the New Xanthan-Producing Strain Xanthomonas campestris M 28: Study of the Genome, Cultivation Conditions, and Physicochemical and Rheological Properties of the Polysaccharide // Appl. Biochem. Microbial. 2021. Vol. 57. № 3. P. 356–365.

4. Revin V. V., Liyas'kina E. V., Sapunova N. B., Bogatyreva A. O. Isolation and characterization of the strains producing bacterial cellulose. Microbiology. 2020. Vol. 89. № 1. P. 86–95.
5. Патент РФ № 2523606, 27.05.2014.
6. Патент РФ № 2681281, 05.03.2019.
7. Патент РФ № 2740710, 20.01.2021.
8. Liyaskina E.V., Rakova N.A., Kitykina A.A., Rusyaeva V.V., Toukach P.V., Fomenkov A., Vainauskas S., Roberts R.J., Revin V.V. Production and characterization of the exopolysaccharide from strain Paenibacillus polymyxa 2020 // PLoS ONE. 2021. Vol.16. e0253482.
9. Патент РФ № 2536973, 27.12.2014.
10. Патент РФ № 2536257, 20.12.2014.
11. Revin V., Liyaskina E., Nazarkina M., Bogatyreva A., Shchankin M. Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products // Braz. J. Microbiol. 2018. Vol. 49. P. 151 – 159.
12. Патент РФ № 2564567. 10.10.2015.
13. Патент РФ № 2733137. 29.09.2020.
14. Патент РФ № 2736061. 11.11.2020.
15. Revin V.V., Nazarova N.B., Tsareva E.E., Liyaskina E.V., Revin V.D., Pestov N.A. Production of Bacterial Cellulose Aerogels With Improved Physico-Mechanical Properties and Antibacterial Effect // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. Vol. 8. P. 603407.
16. Кадималиев Д.А., Ревин В.В., Девятаева А.А., Грунюшкин И.П., Малафеев А.Н. Влияние модификации полимера из гель-пленки бактериальной целлюлозы на ее физико-механичекие свойства и способность ковалентно связывать ферменты // Высокомолекулярные соединения. Серия Б. — 2021. — Т. 63, № 3. — С. 1–7.
17. Kadimaliev D.A., Parchaykina O.V., Syusin I.V., Chairkin I.V., Malafeev A.N., Devyatkin A.A., Revin V.V. Effect of transglutaminase on the properties of films prepared from chitosan and gelatin // Appl. Biochem. Microbial. 2021. Vol. 57, № 3. P. 366-372.
18. Revin V.V., Pestov N.A., Shchankin M.V., Mishkin V.P., Platonov V.I., Uglanov D.A. Study of the Physical and Mechanical Properties of Aerogels Obtained from Bacterial Cellulose // Biomacromolecules. 2019. Vol. 20 (3). P. 1401-1411.
19. Патент РФ № 2700624. 18.09.2019.
20. Патент РФ № 2717777.25.03.2020.
21. Revin V.V., Dolganov A.V., Liyaskina E.V., Nazarova N.B., Balandina A.V., Devyataeva A.A., Revin V.D. Characterizing Bacterial Cellulose Produced by Komagataeibacter sucrofermentans H-110 on Molasses Medium and Obtaining a Biocomposite Based on It for the Adsorption of Fluoride // Polymers. 2021. Vol.13. P. 1422.

UDC 604.2:547.458; 674.812.2. DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-284-286

MICROBIAL POLYSACCHARIDES – THE BASIS FOR NEW GENERATION POLYFUNCTIONAL MATERIALS

Revin V.V., Liyaskina E.V., Pestov N.A., Kadimaliev D.A., Dolganov A.B.

National Research Mordovia State University, Saransk, Russia.
430005, 68 Bolshevistskaya Str., Saransk
e-mail: revinvv2010@yandex.ru

New generation polyfunctional materials based on such microbial polysaccharides as bacterial cellulose, alginate, xanthan, chitosan have been obtained. The possibility of their application as materials with antibacterial, regenerative and haemostatic properties, ultra-low thermal conductivity, density, high noise-absorbing and sorption properties has been shown.

Keywords: microbial polysaccharides, biocomposite materials, bacterial cellulose, alginate, xanthan, levan, chitosan

Currently, there is a rapid growth in scientific research on microbial polysaccharides, which due to their unique properties have great prospects for use as the basis of a new generation of polyfunctional materials [1]. The Department of Biotechnology, Bioengineering and Biochemistry of National Research Mordovian State University has been conducting research in the field of microbial polysaccharides for a long time. Highly productive bacterial strains of *Xanthomonas campestris* - producers of xanthan [2,3], *Komagataeibacter sucrofermentans* and

Komagataeibacter hansenii - producers of bacterial cellulose [4 - 6], *Paenibacillus polymyxa* - producer of levan [7,8] have been obtained. Their full genome sequencing was carried out. Technologies have been developed for the production of bacterial cellulose, xanthan, levan, alginate using cheap waste of biotechnological industries [8 - 11]. Biocomposition materials for medical purposes with antibacterial, regenerative and haemostatic properties on the basis of bacterial cellulose in the form of aerogels, hydrogels and film forms have been developed [12 - 15]. Conditions for immobilization of pepsin and β-galactosidase enzymes onto modified BC films have been developed [16]. Biodegradable chitosan-gelatin films cross-linked with various microbial transglutaminases were obtained [17]. New cellulose-based aerogel materials with ultra-low thermal conductivity, density, high noise absorption properties and sorption capacity have been obtained [15, 18 - 20]. A new biocomposite material with high sorption capacity towards fluorine ions (80.1 mg/g) based on bacterial cellulose and nanosized aluminium oxide films chemically immobilised on its surface by atomic layer deposition was produced [21]. The structure, physico-chemical and physico-mechanical properties of the obtained materials have been studied by IR and NMR spectroscopy, scanning electron microscopy, X-ray structural analysis, etc.

The work was supported by the Russian Ministry of Science and Higher Education (grant FZRS-2020-0003).

References

1. *Revin V.V., Liyaskina E.V. Biotechnology of bacterial exopolysaccharides : textbook. Saransk : Publishing house of Mordov. un-ty, 2019. 192 p.*
2. *Patent RU № 2714638,18.02.2020.*
3. *Revin V.V., Liyaskina E.V., Pokidko B.V., Pimenov N.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Characterization of novel xanthan-producing bacterial strain Xanthomonas campestris M 28 // Appl. Biochem. Microbial. 2021. Vol. 57, № 3. P. 251-261.*
4. *Revin V. V., Liyas'kina E. V., Sapunova N. B., Bogatyreva A. O. Isolation and characterization of the strains producing bacterial cellulose // Microbiology. 2020. Vol. 89. № 1. P. 86–95.*
5. *Patent RU № 2523606, 27.05.2014.*
6. *Patent RU № 2681281, 05.03.2019.*
7. *Patent RU № 2740710, 20.01.2021.*
8. *Liyaskina E.V., Rakova N.A., Kitykina A.A., Rusyaeva V.V., Toukach P.V., Fomenkov A., Vainauskas S., Roberts R.J., Revin V.V. Production and characterization of the exopolysaccharide from strain Paenibacillus polymyxa 2020 // PLoS ONE. 2021. Vol.16. P. e0253482.*
9. *Patent RU № 2536973, 27.12.2014.*
10. *Patent RU № 2536257, 20.12.2014.*
11. *Revin V., Liyaskina E., Nazarkina M., Bogatyreva A., Shchankin M. Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products // Braz. J. Microbiol. 2018. Vol. 49. P. 151 – 159.*
12. *Patent RU № 2564567, 10.10.2015.*
13. *Patent RU № 2733137, 29.09.2020.*
14. *Patent RU № 2736061, 11.11.2020.*
15. *Revin V.V., Nazarova N.B., Tsareva E.E., Liyaskina E.V., Revin V.D., Pestov N.A. Production of Bacterial Cellulose Aerogels With Improved Physico-Mechanical Properties and Antibacterial Effect // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. Vol. 8. P. 603407.*
16. *Kadimaliev D.A., Revin V.V., Devyataeva A.A., Grunyushkin I.P., Malafeev A.N. Effect of bacterial cellulose gel-film polymer modification on its physical and mechanical properties and ability to covalently bind enzymes // High Molecular Compounds. Series B. - 2021. - Vol. 63, № 3. - P. 1-7.*
17. *Kadimaliev D.A., Parchaykina O.V., Syusin I.V., Chairkin I.V., Malafeev A.N., Devyatkin A.A., Revin V.V. Effect of transglutaminase on the properties of films prepared from chitosan and gelatin // Appl. Biochem. Microbial. 2021. Vol. 57, № 3. P. 366-372.*
18. *Revin V.V., Pestov N.A., Shchankin M.V., Mishkin V.P., Platonov V.I., Uglanov D.A. Study of the Physical and Mechanical Properties of Aerogels Obtained from Bacterial Cellulose // Biomacromolecules. 2019. Vol. 20 (3). P. 1401-1411.*
19. *Patent RU № 2700624, 18.09.2019.*
20. *Patent RU № 2717777, 25.03.2020.*
21. *Revin V.V., Dolganov A.V., Liyaskina E.V., Nazarova N.B., Balandina A.V., Devyataeva A.A., Revin V.D. Characterizing Bacterial Cellulose Produced by Komagataeibacter sucrofermentans H-110 on Molasses Medium and Obtaining a Biocomposite Based on It for the Adsorption of Fluoride // Polymers. 2021. Vol.13. P. 1422.*

УДК: 577.15.03:036, ББК: 24.434.61 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-287-289

ФОРМИРОВАНИЕ ПОКРЫТИЙ НА ОСНОВЕ PH- И ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОГЕЛЕЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗНЫХ БИОСЕНСОРНЫХ СИСТЕМ

А.А.Шалыбкова , Т.З.Шарифуллин, Д.В.Пергушов, Л.В.Сиголаева

Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/3, annyshal@mail.ru, 89157125119

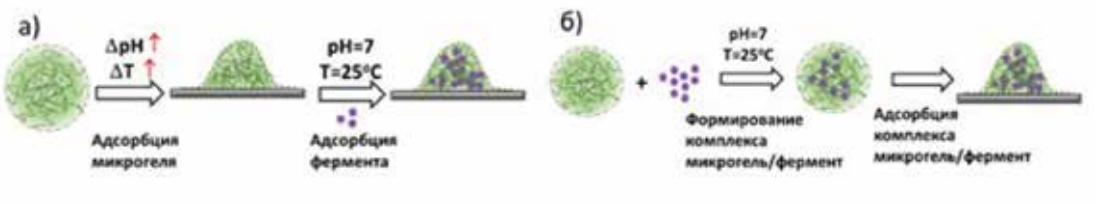
Полимер-ферментные покрытия на основе pH- и термочувствительного микрогеля П(НИПАМ-со-ДМАПМА) и глюкозооксидазы были сформированы двумя различными методами: (а) последовательным нанесением (адсорбцией) полимерного и биокомпонентов и (б) нанесением предварительно приготовленного микрогель-ферментного комплекса. Показано, что метод (а) позволяет получать сенсорные поверхности с более высокими откликами, а метод (б) – с лучшей операционной стабильностью.

Ключевые слова: адсорбция, комплексообразование, тонкие пленки, модификация поверхности, ферментный биосенсор, глюкозооксидаза, стимулчувствительность, микрогель

Одной из ключевых задач при создании ферментных биосенсоров является разработка эффективных подходов к иммобилизации ферментов на сенсорных поверхностях. Именно способ закрепления биомолекулы определяет чувствительность и операционную стабильность биосенсорной системы. Среди перспективных способов иммобилизации ферментов можно выделить модификацию сенсорной поверхности пленками на основе «умных» (стимулчувствительных) полимеров, способных значительно, быстро и обратимо изменять свои свойства при варьировании условий окружающей среды. Особенный интерес представляют собой стимулчувствительные (со)полимерные микрогели [1], которые обладают высокой емкостью по отношению к связываемым биомолекулам и, будучи высокогидратированными, обеспечивают благоприятное микроокружение для иммобилизованных в них ферментов, способствуя сохранению конформации и биологических функций последних [2].

Данная работа посвящена сравнению двух методов формирования полимер-ферментных покрытий на основе pH- и термочувствительного микрогеля, представляющего собой сшитый сополимер N-изопропилакриламида и диметиламинопропилметакриламида (П(НИПАМ-со-ДМАПМА)), и фермента глюкозооксидазы (ГО) (рис. 1), а также их применению для количественного определения глюкозы.

Рис. 1. а) последовательное нанесение (адсорбция) микрогеля и фермента; б) нанесение (адсорбция) предварительно сформированного микрогель-ферментного комплекса.



Адсорбция П(НИПАМ-со-ДМАПМА) микрогеля и дальнейшее связывание им биомолекул (рис. 1а), а также адсорбция предварительно сформированных комплексов П(НИПАМ-со-ДМАПМА)/ГО (рис. 1б) были исследованы методом пьезоэлектрического микровзвешивания с мониторингом диссипации. Это позволило выявить оптимальные условия формирования микрогель-ферментных покрытий, прежде всего температуры и pH (при последовательном нанесении компонентов), а также соотношения полимерного и биокомпонентов и температуры

Полученные результаты были использованы для формирования покрытий П(НИПАМ-со-ДМАПМА)/ГО на поверхности планарных графитовых электродов (предварительно модифицированных наночастицами диоксида марганца для придания пероксидчувствительности) и создания на основе таких конструкций амперометрических глюкозных биосенсоров. Метод последовательного нанесения полимерного и биокомпонентов позволил получить сенсорные покрытия с более высокими откликами, в то время как на-

несение предварительно сформированных микрогель-ферментных комплексов – сенсорные покрытия с лучшей операционной стабильностью.

Последовательное нанесение микрогеля и фермента: 1. Наибольшая адсорбция микрогеля наблюдается в его незаряженном и дегидратированном состоянии 2. Условия адсорбции микрогеля определяют количество связанного фермента 3. Использование последовательного нанесения позволяет создавать более активные биосенсоры Нанесение предварительно сформированного микрогель-ферментного комплекса: 1. Соотношение компонентов влияет на адсорбционную способность комплекса микрогель/фермент 2. Использование комплекса микрогель/фермент позволяет создавать более стабильные биосенсоры

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект 19-08-00483-а).

Литература

1. *Plamper F.A., Richtering W. Functional microgels and microgel systems // Acc. Chem. Res. 2017. Vol. 2. №50. P. 131-140.*
2. *Sigolaeva L.V., Pergushov D.V., Oelmann M. et al. Surface functionalization by stimuli-sensitive microgels for effective enzyme uptake and rational design of biosensor setups // Polymers. 2018. Vol. 7. №10. P. 791.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-287-289

PREPARATION OF COATINGS BASED ON PH- AND THERMOSENSITIVE POLYMERIC MICROGELS FOR ENGINEERING OF GLUCOSE OXIDASE BIOSENSOR SYSTEMS

A.Shalybkova, T.Sharifullin, D.Pergushov, L.Sigolaeva

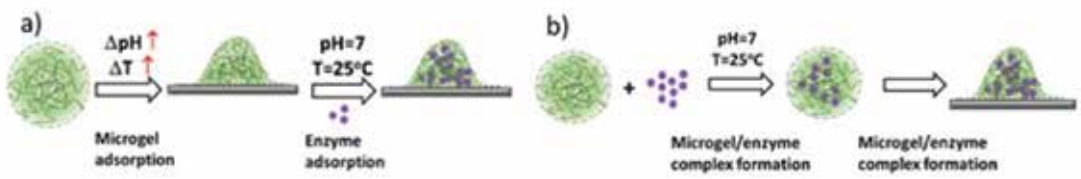
M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Russia, 119991, Moscow, Leninskiye gory, 1/3

Polymer-enzyme coatings based on pH-and thermosensitive microgel P(NIPAM-co-DMAPMA) and glucose oxidase were fabricated via two different ways: (a) a sequential deposition (adsorption) of polymer and bio- components and (b) a deposition of a pre-formed microgel-enzyme complex. It was shown that the way (a) allows obtaining sensor surfaces with higher responses while the method (b) leads to ones with better operational stability.

Key words: adsorption, complex formation, thin films, surface modification, enzyme biosensor, glucose oxidase, stimuli-sensitivity, microgel

The development of efficient approaches for immobilization of biomolecules on sensor surfaces is one of the key challenges for engineering of enzymatic biosensors. Generally, a way of fixation of a biomolecule determines sensitivity and operational stability of a biosensor system. Among the wide variety of methods for immobilization of enzymes, modification of the senor surface by “smart” (stimuli-sensitive) polymers, which are able for significant, fast, and reversible changes of their properties upon variation of environmental conditions, can be emphasized. Of a particular interest are stimuli-responsive (co)polymer microgels [1], which possess high capacity towards biomolecules to be bound and being highly hydrated provide favorable water-rich microenvironment for immobilized enzymes, preserving their conformation and biological functions [2].

Fig. 1. (a) Sequential deposition (adsorption) of a microgel and an enzyme; (b) deposition of a pre-formed microgel-enzyme complex.



This work compares two ways of fabrication of polymer-enzyme coatings based on a pH- and thermosensitive microgel formed by a cross-linked copolymer of N-isopropylacrylamide and N,N-dimethylaminopropyl methacrylamide (P(NIPAM-co-DMAPMA)), and glucose oxidase (GO) as an enzyme (Fig. 1). Application of such coatings for quantitative determination (analysis) of glucose is also reported.

Adsorption of the P(NIPAM-co-DMAPMA) microgel and its further loading with biomolecules (Fig.1a), as well as adsorption of pre-formed P(NIPAM-co-DMAPMA)/GO complexes (Fig.1b) were studied by quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. It has allowed us to reveal the optimal conditions for fabrication of the microgel-enzyme coatings, first of all, temperature and pH (for sequential adsorption of the components) and the polymer/biocomponent ratio and temperature (for adsorption of pre-formed microgel-enzyme complexes).The obtained results were exploited for fabrication of P(NIPAM-

The obtained results were exploited for fabrication of P(NIPAM-co-DMAPMA)/GO coatings on the surface of planar graphite electrodes (that were previously modified with manganese dioxide nanoparticles to impart peroxide sensitivity), which were used to design amperometric glucose biosensors. The sequential adsorption of a polymer and a biocomponent enables to prepare sensor coatings with higher responses, while the adsorption of the pre-formed microgel/enzyme complexes leads to sensor coatings with superior operational stability.

Consequent adsorption of microgel and enzyme films: 1. Maximal microgel adsorption is observed within its uncharged and collapsed state 2. Microgel adsorption conditions determine the amount of binded enzyme 3. Usage of consequent adsorption allows to create high-active biosensors Microgel/enzyme complexes formed in solution: 1. The ratio of components affects the adsorption ability of microgel/enzyme complex 2. Usage of microgel/enzyme complex allows to fabricate high-stable biosensors

Grant: This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project No 19-08-00483-a).

References

1. *Plamper F.A., Richtering W. Functional microgels and microgel systems // Acc. Chem. Res. 2017. Vol. 2. №50. P. 131-140.*
2. *Sigolaeva L.V., Pergushov D.V., Oelmann M. et al. Surface functionalization by stimuli-sensitive microgels for effective enzyme uptake and rational design of biosensor setups // Polymers. 2018. Vol. 7. №10. P. 791.*

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЙ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ: ЗАКОНОМЕРНОСТИ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

BIOLOGICAL TRANSFORMATIONS OF CONTAMINANTS IN THE NATURAL ENVIRONMENT: PATTERNS AND PRACTICAL ASPECTS

1. ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРОМИЦЕТОВ, ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДЕСТРУКТОРОВ ЛИГНИНА, ИЗ ОТХОДОВ ДЕРЕВОПЕРЕРАБАТЫВАЮЩИХ ПРЕДПРИЯТИЙ
Глухова Л.Б., Ивасенко Д.А., Плотников Е.В., Франк Ю.А. 291

ISOLATION OF MICROMYCETES, POTENTIAL LIGNIN DESTRUCTORS, FROM WOOD PROCESSING ENTERPRISES WASTE
Glukhova L.B., Ivasenko D.A., Plotnikov E.V., Frank Yu.A. 291

2. ДЕСТРУКЦИЯ ПЕРСИСТЕНТНЫХ ПОЛЛЮТАНОТОВ ЛИГНИНОЛИТИЧЕСКИМИ ГРИБАМИ
Позднякова Н.Н., Дубровская Е.В., Баландина С.А., Голубев С.Н., Крючкова Е.В., Гринев В.С, Сигида Е.Н., Турковская О.В. 292

DEGRADATION OF PERSISTENT POLLUTANTS BY LIGNINOLYTIC FUNGI
Pozdnyakova N., Dubrovskaya E., Balandina S., Golubev S., Kryuchkova Ye., Grinev V., Sigida E., Turkovskaya O. 293

3. КОНСОРЦИУМЫ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ, СПОСОБНЫЕ ЭФФЕКТИВНО РАЗЛАГАТЬ НЕФТЬ
Файзулина Э.Р., Айткельдиева С.А., Татаркина Л.Г., Баймаханова Г.Б., Спанкулова Г.А. 294

CONSORTIA OF THERMOTOLERANT OIL-OXIDIZING MICROORGANISMS CAPABLE OF EFFICIENTLY DECOMPOSING OIL
Faizulina E.R., Aitkeldiyeva S.A., Tatarkina L.G., Baimakhanova B.G., Spankulova G.A. 296

4. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ СХЕМЫ БИОКОНВЕРСИИ ИЗБЫТОЧНОГО АКТИВНОГО ИЛА ГОРОДСКИХ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ
Франк Ю. А., Перченко Р. В., Бухтиярова П. А., Тыщенко Н.В., Ивасенко Д.А. 297

DEVELOPMENT OF THE TECHNOLOGY FOR BIOCONVERSION OF WASTE ACTIVATED SLUDGE FROM AN URBAN WASTEWATER TREATMENT PLANT
Frank Y. A., Perchenko R. V., Bukhtiyarova P. A., Tyschenko N. V., Ivasenko D. A. 298

УДК: 579.69: 579.26 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-291-292

ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРОМИЦЕТОВ, ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДЕСТРУКТОРОВ ЛИГНИНА, ИЗ ОТХОДОВ ДЕРЕВОПЕРЕРАБАТЫВАЮЩИХ ПРЕДПРИЯТИЙ

Глухова Л.Б., Ивасенко Д.А., Плотников Е.В., Франк Ю.А.

Общество с ограниченной ответственностью «Дарвин», Томск, Россия
634040, Томск, ул. Высоцкого, д.28, ст.3
e-mail: lubov.b.gluhova@gmail.com

Из отвалов деревоперерабатывающего предприятия получены грибные изоляты. Изучена их физиология, и проведена частичная видовая идентификация по региону ITS.

Ключевые слова: микромицеты, лигнин, опилки, отходы, промышленный консорциум.

Необходимость переработки отходов направляет на поиск эффективных средств конверсии. Биологический рециклинг не только эффективен, но и безопасен для окружающей среды. Широкая доступность целлюлозо- и лигнинсодержащих отходов делает их привлекательным сырьем для получения товарных продуктов. Лигнин- и целлюлозосодержащие субстраты представлены отходами растениеводства, деревообработки, ландшафтных хозяйств. Однако, сложное строение лигноцеллюлозосодержащего сырья делает его трудным субстратом для переработки микроорганизмами. Поэтому поиск новых микроорганизмов потенциальных конвертеров лигноцеллюлозы остается актуальной задачей.

Целью работы стало выделение микромицетов, потенциальных деструкторов лигнина, из отходов деревоперерабатывающих предприятий. Для выделения использовали опилки лиственных и хвойных пород деревьев отобранные из промышленных отвалов. Выделение проводилось на селективных питательных с содержанием лигнина в качестве единственного источника органического углерода. В чистые культуры были получены 8 штаммов, относящихся к *Penicillium*, *Mucor* и *Epicoccum*. По результатам анализа физиологии – скорости роста на селективных средах, pH, температурах, для дальнейшей работы были отобраны 5 микромицетов. С хвойных опилок взяты изоляты, обозначенные как CS-ЗС, CS-С, CS1-БВ, CS3-РМ, с опилок лиственных пород деревьев - HS1-ЗС. Анализ универсального грибного таксономического региона ITS показал, что CS-ЗС близкородственен *Penicillium polonicum* (98.49%, MT529602), CS-С *Mucor racemosus* (98.42%, MH931825), CS1-БВ *Penicillium thomii* (100%, MN309718), для изолята CS3-РМ близким стал некультивируемый микромицет (99.84%, MT236592), а ближайшим описанным видом *Epicoccum tritici* (99.43%, KX926426). Микромицет HS1-ЗС был близкородственен *Penicillium westlingii* (99.23%, MH864318). На основе полученных результатов из дальнейшей работы были исключены микромицеты, потенциальные патогенны/ингибиторы растений, а также условные патогенны. Оставшиеся микромицеты были включены в состав промышленного консорциума микроорганизмов для биоконверсии отходов деревообработки.

Исследование поддержано грантом Фонда содействия инновациям по теме "Разработка технологии биоконверсии органических отходов in situ на основе промышленных консорциумов микроорганизмов-продуцентов" (договор №48ГРСОПР-С7-I5/63638 от 11.12.2020).

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-291-292

ISOLATION OF MICROMYCETES, POTENTIAL LIGNIN DESTRUCTORS, FROM WOOD PROCESSING ENTERPRISES WASTE

Glukhova L.B., Ivasenko D.A., Plotnikov E.V., Frank Yu.A.

Limited liability company «Darwin», Tomsk, Russia
634040, Tomsk, Vysotskogo st., 28, building 3
e-mail: lubov.b.gluhova@gmail.com

Fungal isolates were obtained from the dumps of a wood processing enterprise. Their physiology was studied, and partial species identification was carried out in the ITS region.

Key words: micromycetes, lignin, sawdust, waste, industrial microbial consortium.

The need for waste recycling directs the search for effective means of conversion. Biological recycling is not only efficient but also environmentally friendly. The wide availability of cellulose and lignin-containing wastes makes them an attractive raw material for obtaining marketable products. Lignin- and cellulose-containing substrates are represented by wastes of plant growing, woodworking, and landscape farms. However, the complex structure of lignocellulose-containing raw materials makes it a difficult substrate for microorganisms to process. Therefore, the search for new microorganisms of potential lignocellulose converters remains an urgent task.

The aim of the work was to isolate micromycetes, potential lignin destructors, from the waste of wood processing enterprises. For isolation, sawdust of deciduous and coniferous trees taken from industrial dumps was used. Isolation was carried out on selective nutrients with lignin as the only source of organic carbon. In pure cultures were obtained 8 strains belonging to *Penicillium*, *Mucor* and *Epicoccum*. Based on the results of the analysis of physiology - growth rate on selective media, pH, temperatures, 5 micromycetes were selected for further work. Isolates designated as CS-3C, CS-C, CS1-БВ, CS3-PM were taken from coniferous sawdust, and HS1-3C from sawdust of deciduous trees. Analysis of the universal fungal taxonomic region ITS showed that CS-3C is closely related to *Penicillium polonicum* (98.49%, MT529602), CS-C *Mucor racemosus* (98.42%, MH931825), CS1-БВ *Penicillium thomii* (100%, MN309718), for isolate CS3-PM the closest was uncultivated micromycete (99.84%, MT236592), and the closest described species was *Epicoccum tritici* (99.43%, KX926426). *Micromycete* HS1-3C was closely related to *Penicillium westlingii* (99.23%, MH864318). Based on the results obtained, micromycetes, potential plant pathogens / inhibitors, as well as conditional pathogens were excluded from further work. The remaining micromycetes were included in the consortium of microorganisms for the bioconversion of sawdust dumps.

This research was supported by Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises (FASIE) under the project "Development of in situ technology for bioconversion of organic waste based on industrial consortia of microorganisms-producers" (contract No. 48ГРСОПР-С7-I5/63638 от 11.12.2020).

УДК: 579.222.2 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-292-294

ДЕСТРУКЦИЯ ПЕРСИСТЕНТНЫХ ПОЛЛЮТАНОТОВ ЛИГНИНОЛИТИЧЕСКИМИ ГРИБАМИ

Позднякова Н.Н., Дубровская Е.В., Баландина С.А.,
Голубев С.Н., Крючкова Е.В., Гринев В.С, Сигида Е.Н., Турковская О.В.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия
410049, Саратов, проспект Энтузиастов, д. 13
e-mail: pozdnyakova_n@ibppm.ru

На основании скрининга 20 штаммов базидио- и аскомицетов на деструктивную активность по отношению к ПАУ, НПАВ, алкилфенолам, синтетическим красителям и нефти выявлены штаммы грибов, обладающие комплексом свойств, перспективных для их эффективного использования в экобиотехнологиях.

Ключевые слова: базидио- и аскомицеты; микоремедиация, метаболизм персистентных поллютантов; лигнинолитические ферменты.

В последние годы биоремедиация стала важным, а в некоторых случаях основным инструментом восстановления загрязненных объектов. Наиболее активными деструкторами поллютантов являются микроорганизмы, обладающие мощнейшим метаболическим потенциалом и способные минерализовать практически любое органическое вещество. В настоящее время на рынке для осуществления биоремедиации предлагаются, в основном, бактериальные препараты. Вместе с тем, грибы обладают не меньшим, а возможно, и большим детоксикационным потенциалом в отношении персистентных поллютантов. Однако из-за недостаточной изученности этих организмов в приложении к экологическим биотехнологиям их применение ограничено.

Проведен первичный скрининг 20 штаммов лигнинолитических грибов из различных коллекций по деградативной активности в отношении ряда наиболее опасных и распространенных персистентных поллютантов, включая полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), оксиэтилированный нонилфенол (неонол АФ9-12), алкилфенол (изононилфенол), синтетические красители антрахинонового типа (Acid Blue 62 и Reactive Blue) и нефть.

Обнаружено, что все изученные базидиомицеты активно деградировали ***ПАУ*** (антрацен, фенантрен, флуорен), о чем свидетельствовало снижение их концентрации в среде культивирования. Деградация этих веществ варьировала от 16 до 100%. Наиболее активными деструкторами оказались базидиомицеты *Pleurotus ostreatus* MUT2977, *Pleurotus ostreatus* D1, *Lenzites betulina*, *Trametes versicolor* MUT3403, *Trametes maxima* и аскомицет *Cladosporium herbarum*. Установлено, что, несмотря на некоторые различия, деградация ПАУ происходит по одной схеме с образованием хиноновых метаболитов на первом этапе: 9,10-антрахинона в случае антрацена, 9-флуоренона – флуорена, фенантрен-9,10-хинона – фенантрена. Получены данные, подтверждающие, что «глубина» деградации исследованных ПАУ может определяться составом внеклеточного лигнинолитического комплекса.

Антрахинон занимает центральную часть молекул ***синтетических красителей***, так называемого, антрахинонового типа, в связи с чем, они проявляют высокую устойчивость к биодеградации. Обнаружено, что все исследованные базидиомицеты и аскомицет *C. herbarum* полностью обесцвечивали Acid Blue 62 и Reactive Blue 4, при этом для грибной деградации были доступными как хромофорная часть молекулы, так и ароматическое кольцо.

Биоразложение ***неионогенных поверхностно-активных веществ (НПАВ)***, в том числе оксиэтилированных алкилфенолов, происходит с большим трудом, приводя зачастую к образованию устойчивых и токсичных алкилфенолов в качестве конечных метаболитов. Показано, что базидиомицеты *Pleurotus ostreatus f. Florida*, *P. ostreatus* MUT, P. *ostreatus 336*, *P. ostreatus LE-BIN, Bjerkandera adusta, Schizophyllum commune* и аскомицет *C. herbarum* атаковали оксиэтильную цепочку, тогда как ароматическое кольцо оставалось интактным. Деградация неонола *Stropharia rugosoannulata* и *Trametes ochracea* затрагивала только ароматическое кольцо. И, наконец, еще 9 видов грибов разрушали и ту и другую части молекулы неонола, наибольшая активность при этом выявлена у базидиомицета *Trametes gibbosa* и аскомицета *Geotrichum candidum*.

Алкилфенолы, в частности, изононилфенол, являются продуктами неполной деградации оксиэтилированных алкилфенолов. Для большинства исследованных грибов изононилфенол оказался токсичным и его деградация обнаружена только у 5 видов базидиомицетов (*T. versicolor MUT, Len. betulina, P.ostreatus f. Florida, Str. rugosoannulata, Sch. commune*) и одного аскомицета (*C. herbarum*). Наиболее активным деструктором был *Sch. commune*, убыль составила 61%.

В результате природных процессов и хозяйственной деятельности человека в окружающую среду попадают сложные смеси поллютантов, в том числе ***нефть***. Обнаружено, что большинство исследованных деревообитающих базидиомицетов активно утилизировали нефть, при этом убыль составляла от 72 до 92%. Наиболее активными были представители родов *Pleurotus* и *Trametes*. Подстилочный сапротроф *Str. rugosoannulata* деградировал до 90% нефти. Исследованные аскомицеты, за исключением *G. candidum*, также были активными деструкторами нефти, убыль составила от 60 до 84%.

На основании проведенного скрининга по совокупности деградативных свойств, адаптационного потенциала и продукции лигнинолитических ферментов, определены штаммы грибов, перспективные для их эффективного использования в экобиотехнологиях.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-00081).

UDC: 579.222.2 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-292-294

DEGRADATION OF PERSISTENT POLLUTANTS BY LIGNINOLYTIC FUNGI

Pozdnyakova N., Dubrovskaya E., Balandina S.,
Golubev S., Kryuchkova Ye., Grinev V., Sigida E., Turkovskaya O.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences,
13, Prospekt Entuziastov, Saratov 410049, Russia
e-mail: pozdnyakova_n@ibppm.ru

Screening of 20 strains of basidio- and ascomycetes for their degradative activity toward PAHs, nonionic surfactants, alkyl phenols, synthetic dyes, and oil permitted us to select the most active fungi which hold promise for further studies and for use in biotechnology.

Key words: basidio- and ascomycetes; mycoremediation; metabolism of persistent pollutants; ligninolytic enzymes.

Today, bioremediation is an important and, in some cases, the main instrument of decontamination of polluted areas. The principal agents of decontamination of nature from pollutants are microorganisms, which have strong

metabolic potential and can mineralize almost all organic compounds. The preparations currently marketed for the bioremediation of polluted sites are mostly bacteria-based. Although fungi have strong detoxication potential toward persistent pollutants, they have been insufficiently studied and their use in ecological biotechnologies is limited.

We screened 20 strains of ligninolytic fungi from different collections for their degradative activity toward some of the most hazardous, widespread, and persistent pollutants. These pollutants included polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nonionic detergents (neonol AF9-12), alkylphenol (isononyl phenol), anthraquinonic synthetic dyes (Acid Blue 62 and Reactive Blue), and oil.

All the basidiomycetes examined were active in degrading the ***PAHs*** (anthracene, phenanthrene, and fluorene), as evidenced by the decreased concentrations of these pollutants in the cultivation medium. Anthracene, phenanthrene, and fluorene were degraded by 16 to 100%. The most active degraders were the basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* MUT, *Pleurotus ostreatus* D1, *Lenzites betulina, Trametes versicolor* MUT, and *Trametes maxima*, as well as the ascomycete *Cladosporium herbarum*. Despite some differences, the degradation of the three PAHs followed the same scheme, forming quinone metabolites at the first stage: 9,10-anthraquinone with anthracene, 9-fluorenone with fluorene, and phenanthrene-9,10-quinone with phenanthrene. Data were obtained to support our hypothesis that the degree of PAH degradation may depend on the composition of the extracellular ligninolytic complex.

Anthraquinone occupies the central part of the molecules of a wide range of synthetic dyes called ***anthraquinone-type dyes***, which are highly resistant to biodegradation. All the basidiomycetes examined and the ascomycete *C. herbarum* decolorized Acid Blue 62 and Reactive Blue 4 completely. Both chromophoric part of the molecules and aromatic ring were available for fungal degradation.

Nonionic surfactants, including ***oxyethylated alkylphenols***, are difficult to degrade, yielding persistent and toxic alkylphenols as the final metabolites. The basidiomycetes *Pleurotus ostreatus f.* Florida, *P. ostreatus* MUT, *P. ostreatus* 336, *P. ostreatus* LE-BIN, *Bjerkandera adusta*, and *Schizophyllum commune*, as well as the ascomycete *C. herbarum*, attacked the oxyethyl chain, whereas the aromatic ring was intact. The degradation of neonol by *Stropharia rugosoannulata* and *Trametes ochracea* affected only the aromatic ring. The other nine fungal strains degraded both portions of the neonol molecule. The basidiomycete *Trametes gibbosa* and the ascomycete *Geotrichum candidum* were the most active.

Alkylphenols, in particular isononyl phenol, result from incomplete degradation of oxyethylated alkylphenols. Isononyl phenol was toxic to most of the fungi examined by us and was degraded only by five basidiomycetes (*T. versicolor* MUT, *Len. betulina*, *P. ostreatus f.* Florida, *Str. rugosoannulata*, and *Sch. commune*) and one ascomycete (*C. herbarum*). Sch. commune was the most active decomposer, decreasing the content of isononyl phenol by 61%.

Natural processes and the economic activities of humans contaminate the environment with complex pollutant mixtures, including ***oil***. Most of the wood-inhabiting basidiomycetes in this study actively degraded oil; the decreases were from 72 to 92%. The members of the genera *Pleurotus* and *Trametes* were the most active. The litter-decomposing fungus *Str. rugosoannulata* degraded up to 90% of oil. All ascomycetes except *G. candidum* were active decomposers also: the oil decrease ranged from 60 to 84%.

On the basis of our screening data and the fungi's degradative properties, adaptive potential, and ligninolytic enzyme production, we chose the most active fungi, which hold promise for further studies and for use in biotechnology.

This research was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project no. 16-14-00081).

УДК 579.66 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-294-297

КОНСОРЦИУМЫ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ, СПОСОБНЫЕ ЭФФЕКТИВНО РАЗЛАГАТЬ НЕФТЬ

Файзулина Э.Р., Айткельдиева С.А., Татаркина Л.Г., Баймаханова Г.Б., Спанкулова Г.А.

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан
050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 103
e-mail: elmira_f@mail.ru

Изучена способность консорциумов термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов утилизировать нефть при повышенных температурах. При 35°С степень деструкции нефти составила 55-87,3%, при 40°С – 54,8-64,3%, при 50°С – 55-73,2%.

Ключевые слова: нефтяное загрязнение, деструкция нефти, термотолерантные нефтеокисляющие микроорганизмы, консорциум микроорганизмов

Проблема загрязнения природных экосистем нефтью и нефтепродуктами стоит крайне остро во многих странах мира, в том числе и в Казахстане. Значительная часть нефтезагрязненных участков расположена в регионах с жарким климатом. Способность термотолерантных бактерий утилизировать нефть в условиях повышенных температур делает их перспективными агентами биоремедиации загрязненных территорий.

Ранее из нефтезагрязненных почв Атырауской области Республики Казахстан нами были выделены активные штаммы термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов. На основании молекулярно-генетического анализа путем секвенирования 16S рРНК культуры были отнесены к родам *Rhodococcus, Gordonia, Bacillus, Pseudomonas, Achromobacter* и *Brevibacillus*. Изучение их антагонистической активности показало, что они являются толерантными друг к другу. На основе этих штаммов были составлены консорциумы. Была изучена их способность утилизировать нефть месторождения Жанаталап в жидкой минеральной среде Ворошиловой-Диановой в концентрации 2% при повышенных температурах. Остаточное содержание нефти в среде определяли гравиметрическим методом на 14 сутки культивирования.

Результаты исследования показали, что из 9 консорциумов, культивируемых с нефтью при 35оС, семь утилизировали 55-70,6% нефти (таблица). Два наиболее активных консорциума деградировали 83,6% и 87,3% нефти. В их состав входили представители родов Rhodococcus, Gordonia, Pseudomonas. В контрольном варианте естественная убыль нефти составила 16%.

Таблица – Деструкция нефти активными консорциумами при повышенных температурах

Консорциум	Степень деструкции нефти, %		
	35°С	40°С	50°С
Rhodococcus jialingiae 4/5, *Rhodococcus fascians* К-3, *Gordonia amicalis* П1-35-14	83,6	35,8	62,8
Rhodococcus jialingiae 4/5, *Rhodococcus fascians* К-3, *Pseudomonas aeruginosa* П2-35-2	87,3	34,9	60,7
Rhodococcus jialingiae 4/5, *Rhodococcus fascians* К-3, *Bacillus megaterium* П1-35-2	70,6	36,5	60,0
Rhodococcus fascians К-3, *Achromobacter pestifer* 25Ш	62,7	54,8	61,6
Rhodococcus fascians К-3, *Achromobacter pestifer* 25Ш, *Bacillus aerius* КВ-36	70,3	64,3	60,3
Bacillus megaterium П1-35-2, *Gordonia amicalis* П1-35-14, *Pseudomonas aeruginosa* П2-35-2	67,0	39,7	55,0
Rhodococcus fascians К-3, *Brevibacillus borstelensis* П2-50-5	55,0	32,7	73,2
Bacillus subtilis 72, *Rhodococcus fascians* К-3	57,2	42,3	69,9
Rhodococcus fascians К-3, *Brevibacillus borstelensis* П2-50-2	55,1	38,6	67,1
контроль	16,0	16,2	16,3

При 40°С наибольшую активность показали два консорциума. При их культивировании степень деструкции нефти составила 54,8% и 64,3%. В состав первого консорциума входили представители родов *Rhodococcus* и *Achromobacter*. Добавление к ним штамма, представляющего собой бациллы, способствовало увеличению деструкционной способности. Естественная убыль нефти составляла 16,2%.

При 50°С практически все созданные консорциумы эффективно утилизировали нефть. Шесть консорциумов деградировали свыше 60% нефти, а один – 55%. При культивировании трех наиболее активных консорциумов степень утилизации нефти составила 67,1%, 69,9% и 73,2%. Отмечено, что во все активные ассоциации входил штамм *Rhodococcus fascians* К-3. Естественная убыль нефти составила 16,3%.

Таким образом, в результате проведенных исследований были получены консорциумы нефтеокисляющих термотолерантных микроорганизмов, активно разлагающих углеводороды нефти при повышенных температурах.

UDC 579.66 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-294-297

CONSORTIA OF THERMOTOLERANT OIL-OXIDIZING MICROORGANISMS CAPABLE OF EFFICIENTLY DECOMPOSING OIL

Faizulina E.R., Aitkeldiyeva S.A., Tatarkina L.G., Baimakhanova B.G., Spankulova G.A.

LLC «Research and Production Center for Microbiology and Virology», Almaty, Kazakhstan
050010, Almaty, Bogenbay batyr str., 105
e-mail: elmira_f@mail.ru

The ability of consortia of thermotolerant oil-oxidizing microorganisms to utilize oil at elevated temperatures has been studied. At 35°C the degree of oil destruction was 55-87.3%, at 40°C - 54.8-64.3%, at 50°C - 55-73.2%.

Keywords: oil pollution, oil destruction, thermotolerant oil-oxidizing microorganisms, consortia of microorganisms

The problem of pollution of natural ecosystems with oil and oil products is extremely acute in many countries of the world, including Kazakhstan. A significant part of the oil-contaminated areas is located in regions with a hot climate. The ability of thermotolerant bacteria to utilize oil at elevated temperatures makes them promising agents for bioremediation of contaminated areas.

Earlier, we isolated active strains of thermotolerant oil-oxidizing microorganisms from oil-contaminated soils of the Atyrau region of the Republic of Kazakhstan. Based on molecular genetic analysis by 16S rRNA sequencing, the cultures were assigned to the genera *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter,* and *Brevibacillus*. The study of their antagonistic activity showed that they were tolerant to each other. Consortia were formed based on these strains. Their ability to utilize oil from the Zhanatalap field in a liquid mineral medium Voroshilova-Dianova at a concentration of 2% at elevated temperatures was studied. The residual oil content in the medium was determined by the gravimetric method on the 14th day of cultivation.

The results of the study showed that out of 9 consortia cultivated with oil at 35°C, seven utilized 55-70.6% of the oil (table). The two most active consortia have degraded 83.6% and 87.3% of oil. They included representatives of the genera *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Pseudomonas*. In the control variant the natural loss of oil was 16%.

Table - Oil destruction by active consortia at elevated temperatures

Consortium	Degree of oil destruction, %		
	35°C	40°C	50°C
Rhodococcus jialingiae 4/5, *Rhodococcus fascians* K-3, *Gordonia amicalis* П1-35-14	83,6	35,8	62,8
Rhodococcus jialingiae 4/5, *Rhodococcus fascians* K-3, *Pseudomonas aeruginosa* П2-35-2	87,3	34,9	60,7
Rhodococcus jialingiae 4/5, *Rhodococcus fascians* K-3, *Bacillus megaterium* П1-35-2	70,6	36,5	60,0
Rhodococcus fascians K-3, *Achromobacter pestifer* 25Ш	62,7	54,8	61,6
Rhodococcus fascians K-3, *Achromobacter pestifer* 25Ш, *Bacillus aerius* KB-36	70,3	64,3	60,3
Bacillus megaterium П1-35-2, *Gordonia amicalis* П1-35-14, *Pseudomonas aeruginosa* П2-35-2	67,0	39,7	55,0
Rhodococcus fascians K-3, *Brevibacillus borstelensis* П2-50-5	55,0	32,7	73,2
Bacillus subtilis 72, *Rhodococcus fascians* K-3	57,2	42,3	69,9
Rhodococcus fascians K-3, *Brevibacillus borstelensis* П2-50-2	55,1	38,6	67,1
control	16,0	16,2	16,3

At 40°C two consortia showed the highest activity. During their cultivation the degree of oil destruction was 54.8% and 64.3%. The first consortium included representatives of the genera *Rhodococcus* and *Achromobacter*. The addition of a bacillus strain to them contributed to an increase in destructive capacity. Natural loss of oil was 16.2%.

At 50°C virtually all of the consortia created effectively utilized oil. Six consortia degraded over 60% of oil, and one - 55%. With the cultivation of the three most active consortia, the degree of oil utilization was 67.1%, 69.9% and 73.2%. It was noted that all active associations included the *Rhodococcus fascians* K-3 strain. Natural loss of oil was 16.3%.

Thus, as a result of the studies carried out, consortia of oil-oxidizing thermotolerant microorganisms that actively decompose oil hydrocarbons at elevated temperatures were obtained.

УДК 579.69 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-297-299

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ СХЕМЫ БИОКОНВЕРСИИ ИЗБЫТОЧНОГО АКТИВНОГО ИЛА ГОРОДСКИХ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ

Франк Ю.А., Перченко Р.В., Бухтиярова П.А., Тыщенко Н.В., Ивасенко Д.А.

ООО «Дарвин», Томск, Россия
634040, Томск, ул. В. Высоцкого, д.28, стр. 3
e-mail: bio.darwin@mail.ru

Проведены опытно-промышленные испытания биокомпостирования избыточного активного ила городских очистных сооружений с использованием консорциума термофильных и термотолерантных бактерий. Наиболее эффективным оказалась биоконверсия активного ила совместно с сосновыми опилками в соотношениях 1:1 или 1:2 с применением принудительной аэрации смеси (0.35 м^3/мин).

Ключевые слова: биоконверсия; избыточный активный ил; углеродсодержащий субстрат; консорциум микроорганизмов.

Хранение избыточного активного ила (АИ), образующегося при очистке коммунальных сточных вод, представляет проблему для предприятий водоочистки, поскольку этот вид отходов образуется постоянно и в больших количествах. АИ может служить сырьем для получения грунтов и органических удобрений. Применение непереработанного АИ для этих целей связано с рисками для окружающей среды и здоровья человека из-за содержания синтетических органических загрязнителей, металлов, патогенных микроорганизмов (Uçaroğlu, Alkan, 2016). Поэтому разработка эффективных технологических схем компостирования АИ, включающих высокотемпературную стадию микробной биоконверсии органических веществ в составе отходов, очень актуальна.

Особенности химического и микробиологического состава АИ разных населенных пунктов могут дополнительно влиять на свойства конечного продукта.

В связи с этим цель работы состояла в поиске оптимальных параметров эффективного биокомпостирования избыточного АИ городских очистных сооружений г. Томска, включая разработку рецепта смеси и подбор условий аэрации. Опытно-промышленные испытания процесса компостирования проводили в июле-августе 2021 года. Основным сырьем для компостирования в буртах служил АИ, накопленный в иловых картах предприятия, с массовой долей C 21.5% и N 2.05%. В качестве углеродсодержащего субстрата и структурирующей добавки использовали сосновые опилки, так как показано, что источники углерода при компостировани АИ влияют на конверсию соединений азота и улучшают качество компоста (Meng et al., 2021). Опилки содержали 43.6% C и 0.17% N. Тестировали смеси с соотношением АИ:опилки, составляющим 1:1, 1:2, 2:1. При составлении смесей учитывали влажность и плотность компонентов.

Для биоконверсии отходов добавляли консорциум термофильных и термотолернатных микроорганизмов, включающий 5 штаммов непатогенных органотрофных бактерий, в том числе аборигенный штамм *Anoxybacillus kamchatkensis* AS-GOS-2, выделенный из АИ очистных сооружений г. Томска, и штамм *Pseudoxanthomonas taiwanensis* PM-cell с целлюлолитической активностью.

Ранее показано, что в аэробных системах компостирования АИ микробное сообщество гораздо активнее, чем в анаэробных процессах (Bian et al., 2017). Поэтому, наряду с контрольными условиями без аэрации смеси, проведены испытания в вариантах (1) с периодическим ворошением смеси и (2) с принудительной аэрацией через систему перфорированных трубок, в которые непрерывно осуществляли подачу воздуха (0.35 м^3/мин).

Для оценки хода процесса проводили мониторинг температуры смеси на глубине 30-40 см. Температурный контроль показал, что биотермический процесс был наиболее активным в буртах с добавлением консорциума микроорганизмов (1 л на каждый куб. м смеси) при соотношениях АИ к опилкам 1:1 и 1:2. В этих вариантах было обеспечено соотношение C:N, равное 23 и 31. Максимальные температуры в этих двух вариантах достигали 67-68 °С уже через 7-8 суток компостирования с аэрацией (в среднем 49-52 °С), а процесс компостирования полностью завершился через 6 недель после начала эксперимента. В контроле без микроорганизмов с теми же условиями аэрации максимум составил 56 °С через 18 суток, средняя температура 44 °С. В варианте с увеличенным пропорциональным содержанием АИ:опилки (2:1) температуры были еще ниже (в среднем 33 °С в присутствии консорциума и принудительной аэрации).

На финальной стадии компостирования смесь тестировали на фитотоксичность с использованием кресс-салата (*Lepidium sativum L.*) в количестве 1 г на 100 г смеси, проводя посевы семян в закрытые емкости. Оценивали также численность бактерий группы кишечной палочки (БГКП) в образцах компоста на жидкой среде Кесслера методом предельных разведений. Фитотест с использованием семян кресс-салата показал отсутствие фитотоксичности для всех полученных образцов компоста. Однако в буртах с соотношением АИ:опилки 2:1 во всех протестированных вариантах аэрации зафиксировано высокое содержание БГКП. В вариантах без аэрации и с аэрацией путем периодического ворошения содержание БГКП также было выше допустимого уровня (<10 кл/г).

Таким образом, опытно-промышленные испытания показали эффективность процесса биокомпостирования избыточного активного ила городских очистных сооружений совместно с сосновыми опилками в соотношениях 1:1 или 1:2 с применением принудительной аэрации смеси.

Исследование поддержано грантом Фонда содействия инновациям по теме "Разработка технологии биоконверсии органических отходов *in situ* на основе промышленных консорциумов микроорганизмов-продуцентов" (договор №48ГРСОПР-С7-I5/63638 от 11.12.2020).

Литература

1. *Bian R., Sun Y., Li W., Ma Q., Chai X. Co-composting of municipal solid waste mixed with matured sewage sludge: The relationship between N2O emissions and denitrifying gene abundance//Chemosphere. 2017. Vol. 189. P. 581–589.*
2. *Meng L., Li W., Zhang S., Zhang X., Zhao Y. and Chen L. Improving sewage sludge compost process and quality by carbon sources addition//Sci Rep. 2021. Vol. 11. 1319.*
3. *Uçaroğlu S. and Alkan U. Composting of wastewater treatment sludge with different bulking agents//JA&WMA. 2016. Vol. 66. № 3. P. 288-295.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-297-299

DEVELOPMENT OF THE TECHNOLOGY FOR BIOCONVERSION OF WASTE ACTIVATED SLUDGE FROM AN URBAN WASTEWATER TREATMENT PLANT

Frank Y.A., Perchenko R.V., Bukhtiyarova P.A., Tyschenko N.V., Ivasenko D.A.

Darwin LLC, Tomsk, Russia
634040, Tomsk, V. Vysotskogo Str., 28/3
e-mail: yulia.a.frank@gmail.com

Pilot tests of the composting of waste activated sludge in an urban wastewater treatment plant with a consortium of thermophilic and thermotolerant bacteria has been carried out. The most effective was the bioconversion of activated sludge together with pine sawdust in a ratio of 1:1 or 1:2 using forced aeration of the mixture (0.35 m^3/min).

Key words: bioconversion; waste activated sludge; carbon-containing substrate; microbial consortium.

The storage of waste activated sludge (AS) generated during municipal wastewater treatment is a problem for water treatment plants, since this type of waste is generated constantly and in large quantities. Meanwhile, AS can serve as a raw material for making artificial soils and organic fertilizers. The use of unprocessed AS for these purposes is associated with environmental risks due to the content of synthetic organic pollutants, metals, pathogenic microorganisms (Uçaroğlu, Alkan, 2016). Therefore, the development of effective biotechnologies for AS composting, including a high-temperature stage of microbial bioconversion of organic substances of the waste, is very urgent.

Features of the chemical and microbiological composition of AS in different settlements may additionally affect the properties of the final product. In this regard, the aim of the work was to find the optimal parameters for effective composting of waste AS of urban wastewater treatment plant in Tomsk, including the development of a mixture recipe and testing of aeration conditions. Pilot tests of the composting process were carried out in July-August 2021. The main raw material for composting in piles was AS, accumulated in the sludge storage of the plant, with a mass fraction of C 21.5% and N 2.05%. Pine sawdust wastes were used as a carbonaceous substrate and bulk additive, since it has been shown that carbon sources during composting AS affect the conversion of nitrogen compounds and improve the quality of the compost (Meng et al., 2021). The sawdust contained 43.6% C and 0.17% N. The mixtures with the AS:sawdust ratio of 1:1, 1:2, 2:1 were tested. When composing the mixtures, the moisture and density of the components were taken into account.

For the bioconversion of waste, a 5 strains consortium of non-pathogenic organotrophic bacteria thermophilic and thermotolerant microorganisms was added, including the indigenous strain of *Anoxybacillus kamchatkensis* AS-GOS-2, isolated from the given AS before and cellulolytic bacteria *Pseudoxanthomonas taiwanensis* PM-cell.

It was previously shown that in aerobic composting systems for AS, the microbial community is much more active than in anaerobic processes (Bian et al., 2017). Therefore, along with the control conditions without aeration of the mixture, tests were carried out in piles (1) with periodic tedding of the mixture and (2) with forced aeration through a system of perforated tubes with continuous suppling of air (0.35 m^3/min).

To assess the progress of the composting, the temperature of the mixture was monitored at a depth of 30-40 cm. Temperature control showed that the thermophilic phase was the most expressed in the piles with the addition of the microbial consortium (1 liter for each cubic meter of the mixture) at the ratio of AS to sawdust 1:1 and 1:2. In these variants, a C:N ratio of 23 and 31 was ensured. The maximum temperatures in these two variants reached 67-68 ºC already after 7-8 days of composting with aeration (on average 49-52 ºC), and the composting process was completed after 6 weeks after the start of the experiment. In the control without microorganisms with the same aeration conditions, the maximum was 56 ºC after 18 days and the average temperature was 44 ºC. In the variant with an increased proportion of AS to sawdust (2:1), the temperatures were even lower (on average 33 ºC in the presence of a consortium and forced aeration).

At the final stage, the compost was tested for phytotoxicity using watercress (*Lepidium sativum L.*) by sowing seeds in closed transparent containers in an amount of 1 g per 100 g of the compost. The number of bacteria of the *Escherichia coli* group in compost samples on Kessler's liquid medium was also assessed. A test using watercress seeds showed no phytotoxicity for all compost samples obtained. However, in piles with a ratio of AS to sawdust of 2:1 at all tested aeration options, a high content of *E.coli*-group bacteria was recorded. In variants without aeration and with aeration by means of periodic tedding, the pathogenic bacteria content was also higher than the permissible level (<10 cells per g).

Thus, pilot tests have shown the effectiveness of the process of biocomposting waste activated sludge of urban wastewater treatment plant together with pine sawdust in a ratio of 1:1 or 1:2 with the use of forced aeration of the mixture.

This research was supported by Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises (FASIE) under the project "Development of *in situ* technology for bioconversion of organic waste based on industrial consortia of microorganisms-producers" (contract No. 48ГРСОПР-С7-I5/63638 от 11.12.2020).

References

1. *Bian R., Sun Y., Li W., Ma Q., Chai X. Co-composting of municipal solid waste mixed with matured sewage sludge: The relationship between N2O emissions and denitrifying gene abundance//Chemosphere. 2017. Vol. 189. P. 581–589.*
2. *Meng L., Li W., Zhang S., Zhang X., Zhao Y. and Chen L. Improving sewage sludge compost process and quality by carbon sources addition//Sci Rep. 2021. Vol. 11. 1319.*
3. *Uçaroğlu S. and Alkan U. Composting of wastewater treatment sludge with different bulking agents//JA&WMA. 2016. Vol. 66. № 3. P. 288-295.*

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ И КОРМОВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

GENETIC RESOURCES AND BIOTECHNOLOGY PROCESSES IN FOOD AND FEED INDUSTRY

1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕНООБРАЗУЮЩИХ СПОСОБНОСТЕЙ КОМПЛЕКСОВ ОСНОВНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ ГИДРОФОБНОЙ ПРИРОДЫ
Балакина Е.С., Комарова А.П., Чеботарёв С.А., Зеликина Д.В., Антипова А.С., Мартиросова Е.И., Анохина М.С., Семёнова М.Г. 302

COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF THE FOAMING PROPERTIES OF COMPLEXES BASED ON MAIN MILK PROTEINS AND HYDROPHOBIC BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES
Balakina E.S., Komarova A.P., Chebotarev S.A., Zelikina D.V., Antipova A.S., Martirosova E.I., Anokhina M.S., Semenova M.G. 303

2. ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТА ИЗ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ В ТЕХНОЛОГИИ ОБРАБОТКИ ПЛОДОВ ПЕРЕД ЗАКЛАДКОЙ НА ХРАНЕНИЕ
Григорьевская И.И., Юшина Е.А. 304

APPLICATION OF THE PREPARATION FROM MICROSCOPIC FUNGI IN THE TECHNOLOGY OF FRUIT PROCESSING BEFORE LAYING FOR STORAGE
Grigorevskaya I.I., Yushina E.A. 305

3. КОМПЛЕКС ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ КОНВЕРСИИ БИОКОМПОНЕНТОВ КУРАГИ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ПИЩЕВЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ ДЛЯ СПИРТНЫХ НАПИТКОВ
Головачёва Н.Е., Абрамова И.М., Морозова С.С., Галлямова Л.П. 306

COMPLEX OF ENZYMES FOR EFFICIENT CONVERSION OF DRIED APRICOT BIOCOMPONENTS IN THE PRODUCTION OF FOOD INGREDIENTS FOR ALCOHOLIC BEVERAGES
Golovacheva N.E., Abramova I.M., Morozova S.S., Gallyamova L.P. 307

4. РАЗРАБОТКА ИММУНОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПОДЛИННОСТИ И СОСТАВА МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ
Жердев А.В., Зверева Е.А., Гендриксон О.Д., Поправко Д.С., Дзантиев Б.Б. 308

DEVELOPMENT OF IMMUNOCHEMICAL SYSTEMS TO CONTROL AUTHENTICITY AND COMPOSITION OF MEAT PRODUCTS
Zherdev A.V., Zvereva E.A., Hendrickson O.D., Popravko D.S., Dzantiev B.B. 309

5. ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОЛОКОСОДЕРЖАЩЕГО НАПИТКА С ГИДРОЛИЗАТОМ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ
Мельникова Е.И., Богданова Е.В. 310

HYPOLIPIDEMIC PROPERTIES OF A MILK-CONTAINING DRINK SUPPLEMENTED WITH WHEY PROTEIN HYDROLYSATE
E.I. Melnikova, E.V. Bogdanova 311

6. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОГО ПИЩЕВОГО ИНГРЕДИЕНТА: ИСТОЧНИКА ФИТОЭКДИСТЕРОИДОВ И ФЛАВОНОИДОВ ИЗ ЗЕРНА КИНОА
Н.А. Петров, С.Н. Зорин, Н.А. Бирюлина, Ю.С. Сидорова 312

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF A NEW FOOD INGREDIENT: A SOURCE OF PHYTOECDYSTEROIDS AND FLAVONOIDS FROM QUINOA GRAIN
N. Petrov, S. Zorin, N. Biryulina, Y. Sidorova 313

7. НОВЫЕ ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ С ДРОЖЖАМИ-ПРОБИОТИКАМИ
Рябцева С. А., Храмцов А.Г., Сазанова С.Н. 314

NEW FOOD PRODUCTS WITH PROBIOTIC YEAST
Ryabtseva S.A. , Khramtsov A.G. , Sazanova S.N. 315

8. ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В РЕГУЛЯТОРНОЙ ОБЛАСТИ ОПЕРОНА ilvBNC НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ОПЕРОНА, АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА AHAS И ПРОДУКЦИЮ L-ВАЛИНА В ШТАММАХ CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM
Рябченко Л.Е, Леонова Т.Е., Калинина Т.И., Герасимова Т.В., Титов И.И., Яненко А.С. 316

EFFECT OF MUTATIONS IN THE REGULATORY REGION OF OPERON ilvBNC ON EXPRESSION OF OPERON GENES, ACTIVITY OF THE ENZYME AHAS AND PRODUCTION OF L-VALINE IN CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM STRAINS
Ryabchenko L.E., Leonova T.E., Kalinina T.I., Gerasimova T.V., Titov I.I., Yanenko A.S. 317

9. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ ТРАНСКРИПЦИОННОГО РЕГУЛЯТОРА LRP ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПУТЕЙ БИОСИНТЕЗА ВАЛИНА В КЛЕТКАХ CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM
Самарин А.А., Дербиков Д.Д., Яненко А.С. 318

USAGE OF TRANSCRIPTIONAL REGULATOR LRP BASED BIOSENSOR FOR RESEARCH OF VALINE BIOSYNTHESIS PATHWAYS IN CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM CELLS
Samarin A.A., Derbikov D.D., Yanenko A.S. 319

10. ОСОБЕННОСТИ БИОКОНВЕРСИИ СОЕВОГО СЫРЬЯ В ФЕРМЕНТИРОВАННЫЕ ПРОДУКТЫ
Серба Е.М., Римарева Л.В., Таджибова П.Ю., Погоржельская Н.С., Игнатова Н.И., Оверченко М.Б. 320

FEATURES OF THE BIOCONVERSION OF SOY RAW MATERIALS INTO FERMENTED PRODUCTS
Serba E.M., Rimareva L.V., Tadjibova P.Yu., Pogorzhelskaya N.S., Ignatova N.I., Overchenko M.B. 321

11. РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ АНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЛЯ КОНТРОЛЯ СОДЕРЖАНИЯ ОСНОВНЫХ НЕМЯСНЫХ ДОБАВОК В МЯСОПРОДУКТАХ
Смирнова Н.И., Зверева Е.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. 322

DEVELOPMENT OF IMMUNOENZYME ANALYTICAL SYSTEMS FOR CONTROL OF THE CONTENT OF MAIN NON-MEAT COMPOUNDS IN PROCESSED MEAT PRODUCTS
Smirnova N.I., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. 323

12. БИОКОНВЕРСИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ В СПИРТ И КОРМОПРОДУКТЫ ПО ЗАМКНУТОМУ ЦИКЛУ
Абрамова И.М., Туршатов М.В., Кривченко В.А., Соловьев А.О., Никитенко В.Д. 324

BIOCONVERSION OF PLANT RAW MATERIALS INTO ETHANOL AND FEED PRODUCTS IN A CLOSED CYCLE
Abramova I.M., Turshatov M.V., Krivchenko V.A., Solovyev A.O., Nikitenko V.D. 325

13. ПРОДУКТ ЭНТЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ НА МЯСНОЙ ОСНОВЕ ДЛЯ НЕЙРОРЕАБИЛИТАЦИИ
Федулова Л.В., Чернуха И.М., Василевская Е.Р. 326

MEAT-BASED ENTERAL NUTRITION FOR NEURO REHABILITATION
Fedulova L.V., Chernukha I.M., Vasilevskaya E.R. 328

14. ТЕХНОЛОГИЯ ВЫРАЩИВАНИЯ ДРОЖЖЕЙ НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ ИЗ ЗЕЛЕНОЙ МАССЫ СИЛЬФИИ ПРОНЗЕННОЛИСТНОЙ
Б.Г. Цугкиев,В.Б. Цугкиева, А.М. Хозиев, Л.Б. Дзантиева, И.Э.Солдатова 329

TECHNOLOGY TO CULTURE YEASTS IN CULTURE MEDIA OF CUP PLANT GREEN MASS
B.G. Tsugkiev, V.B. Tsugkieva, A.M. Khoziev, L.B. Dzantieva, I.E. Soldatova 330

15. РАЗРАБОТКА ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА МАРАЛА НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ KLUYVEROMYCES LACTIS
Беленькая С.В., Ельчанинов В.В., Щербаков Д.Н. 331

DEVELOPMENT OF A PRODUCER OF RECOMBINANT MARAL CHYMOSIN BASED ON THE YEAST KLUYVEROMYCES LACTIS
Belenkaya S.V., Elchaninov V.V., Shcherbakov D.N. 332

УДК 544.3.03: 544.032: 544.77 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-302-304

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕНООБРАЗУЮЩИХ СПОСОБНОСТЕЙ КОМПЛЕКСОВ ОСНОВНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ ГИДРОФОБНОЙ ПРИРОДЫ

Балакина Е.С.[1,2], **Комарова А.П.**[1,2], **Чеботарёв С.А.**[1],
Зеликина Д.В.[1], **Антипова А.С.**[1], **Мартиросова Е.И.**[1], **Анохина М.С.**[1], **Семёнова М.Г.**[1]

[1] *Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия; 119334 Москва, ул. Косыгина, д. 4*
[2] *Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия; 125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9*
E-mail: balakinakaterina1999@gmail.com

Изучены пенообразующие свойства комплексов молочных белков (казеината натрия и изолята сывороточных белков) с биологически активными веществами гидрофобной природы (фосфатидилхолином, рыбьим жиром и эфирным маслом гвоздики).

Ключевые слова: белки молока, рыбий жир, фосфатидилхолин, эфирное масло гвоздики, пенообразующие свойства, функциональные ингредиенты

К настоящему моменту все больше данных свидетельствует о том, что основные молочные белки (казеины, сывороточные белки) являются не только ценным источником незаменимых аминокислот, но и основным источником биологически активных пептидов [1]. Так, например, установлено участие отдельных молочных белков в регуляции иммунной, сердечно-сосудистой, нервной, желудочно- кишечной систем [1], доказаны их высокие антиоксидантные, противодиабетические и противовоспалительные свойства [2-4]. При этом высокие инкапсулирующие способности молочных белков по отношению к различным биологически активным веществам делают их особенно привлекательными для получения инновационных ингредиентов многостороннего профилактического и терапевтического действия для функциональных продуктов питания [1-4]. Целью данного исследования явилась сравнительная характеристика структурообразующих (а именно, пенообразующих) способностей комплексов основных молочных белков (казеината натрия (Каз-Na) и изолята сывороточных белков молока (ИСБ)) с такими биологически активными веществами, как рыбий жир (РЖ – источник длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот), фосфатидилхолин сои (ФХ – основной фосфолипид клеточных мембран и гепатопротектор) и эфирное масло гвоздики (ЭМГ – растительный антиоксидант). При этом первоначально были сформированы липосомы ФХ, обогащённые РЖ в отсутствии и в присутствии ЭМГ, а затем эти липосомы были инкапсулированы Каз-Na и ИСБ. Полученные водорастворимые и наноразмерные комплексные частицы были всесторонне охарактеризованы с помощью методов лазерного светорассеяния и тензиометрии. Пенообразующие способности комплексов оценивались по следующим параметрам: скорость формирования пен; объёмный % воздуха в пене; кратность пены; скорость дренажа жидкости из пены; время полураспада пены.

Результаты работы указывают на более высокую поверхностную активность на границе раздела фаз вода-воздух и лучшие пенообразующие свойства комплексных частиц на основе Каз-Na. Установлены прямые взаимосвязи между пенообразующими способностями изученных наноразмерных частиц и их молекулярными (степень ассоциации белков в комплексах с липосомами) и термодинамическими (термодинамическое сродство к водной среде; величина поверхностного натяжения на границе раздела воздух-вода) параметрами.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-16-00085, https://rscf.ru/project/21-16-00085/. Авторы выражают благодарность компании Lipoid за бесплатную поставку образца фосфатидилхолина. Работа А.М.С., как оператора научного оборудования, используемого в этой работе, оплачивалась из государственного бюджета.

Литература

1. *Рязанцева К.А. Гидролизаты сывороточного белка как источник биологически активных липидов для включения в функциональные продукты питания / К.А. Рязанцева // Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством. – 2020. – Т. 1. – № 1.– С. 475-480.*
2. *Донская Г.А. Антиоксидантные свойства нативного молока и молочных белков / Г.А. Донская, И.В. Чумакова, В.М. Дрожжин, Е.И. Добриян // Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством. – 2020. – Т. 1. – № 1. – С. 171-180.*

3. Zelikina D.V. Functional food compositions based on whey protein isolate, fish oil and soy phospholipids/ D.V. Zelikina, M.D. Gureeva, S.A. Chebotarev, Y.V. Samuseva [et al.]// Food systems. – 2020. – V. 3. – № 1. – P. 16-20.
4. Patel, S. Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead / S. Patel // Journal of Functional Foods. – 2015. – N. 19. – P. 308–319.

UDC 544.3.03: 544.032: 544.77 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-302-304

COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF THE FOAMING PROPERTIES OF COMPLEXES BASED ON MAIN MILK PROTEINS AND HYDROPHOBIC BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Balakina E.S.[1,2], **Komarova A.P.**[1,2], **Chebotarev S.A.**[1], **Zelikina D.V.**[1], **Antipova A.S.**[1], **Martirosova E.I.**[1], **Anokhina M.S.**[1], **Semenova M.G.**[1]

[1] N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia 119334 Moscow, Kosygin str., 4,
[2] D. I. Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia 125047 Moscow, Miusskaya sq., 9
E-mail: balakinakaterina1999@gmail.com

Foaming properties were studied for the complexes of milk proteins (sodium caseinate or whey protein isolate) with hydrophobic biologically active substances (phosphatidylcholine, fish oil and essential oil of clove bud).

Key words: milk proteins, fish oil, phosphatidylcholine, essential oil of clove bud, foaming properties, functional ingredients

To date, there is more and more evidence that main milk proteins (caseins, whey proteins) are not only a valuable source of essential amino acids, but also the main source of biologically active peptides [1]. For example, it has been established the participation of certain milk proteins in the regulation of the immune, cardiovascular, nervous, gastrointestinal systems [1]. In addition, it has been proven their high antioxidant, antidiabetic, and anti-inflammatory properties [2-4]. At the same time, the high encapsulating abilities of milk proteins in relation to various biologically active substances make them especially attractive for the production of innovative ingredients of multifaceted preventive and therapeutic action for functional food products. [1-4]. The purpose of this study was a comparative characteristic of the structure-forming (namely, foaming) abilities of complexes based on main milk proteins (sodium caseinate (SC) and whey milk protein isolate (WPI)) with biologically active substances such as fish oil (FO is a source of long-chain polyunsaturated fatty acids), soy phosphatidylcholine (PC is the major phospholipid of cell membranes and hepato-protector), and essential oil of clove bud (EOC is a plant antioxidant). In this case, PC liposomes were initially formed and enriched with FO in the absence or presence of EOC, and then these liposomes were encapsulated by SC and WPI. The obtained water-soluble and nanosized complex particles were comprehensively characterized using laser light scattering and tensiometry. The foaming capacity of the complexes was evaluated according to the following parameters: the rate of the foam formation; overrun; the foam expansion factor; the rate of drainage of liquid from the foam; half-life time of the foam.

The results of the work indicate a higher surface activity at the air-water interface and better foaming properties of the complex particles based on SC. Direct relationships have been established between the foaming abilities of the studied nanosized particles and their molecular (the degree of association of the proteins in their complexes with liposomes) and thermodynamic (thermodynamic affinity for an aqueous medium; the value of surface tension at the air-water interface) parameters.

The research was carried out at the expense of the Russian Science Foundation grant No. 21-16-00085, https://rscf.ru/project/21-16-00085/. The authors are grateful to the Lipoid for the free supply of the phosphatidylcholine sample. The work of A.M.S, as the operator of the scientific equipment used in this work, was financially supported by the state budget.

References

1. Ryazantseva K. A. Whey protein hydrolysates as the source of peptides biological activity for the incorporation into functional food products / K.A. Ryazantseva // Topical issues of the dairy industry, cross-industry technologies and quality management systems. – 2020. – V.1. –N. 1. – P. 475-480.
2. Donskaya G.A. Antioxidant properties of native milk and milk proteins / G.A. Donskaya, I.V. Chumakova, V.M. Drozhin, E.I. Dobriyan // Topical issues of the dairy industry, cross-industry technologies and quality management systems. – 2020. – V.1. – N. 1. – P. 171-180.

3. Zelikina D.V. Functional food compositions based on whey protein isolate, fish oil and soy phospholipids/ D.V. Zelikina, M.D. Gureeva, S.A. Chebotarev, Y.V. Samuseva [et al.]// Food systems. – 2020. – V. 3. – N.1. – P. 16-20.
4. Patel, S. Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead / S. Patel // Journal of Functional Foods. – 2015. –19. – P. 308–319.

УДК 573.6.086.83 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-304-306

ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТА ИЗ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ В ТЕХНОЛОГИИ ОБРАБОТКИ ПЛОДОВ ПЕРЕД ЗАКЛАДКОЙ НА ХРАНЕНИЕ

Григорьевская И.И.1, Юшина Е.А.2

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Академия Государственной противопожарной службы Министерства Российской Федерации по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий", Москва, Россия. 129366, Москва, ул. Бориса Галушкина, 4

*[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств», Москва, Россия.
125080, Москва, Волоколамское шоссе, дом.11
e-mail: irina-i-05@list.ru*

Применение препарата из биомассы микромицета Mortierella polycephala обеспечивает повышение надежности защиты плодов от микробиальной порчи и увеличение срока хранения плодов

Ключевые слова: иммуностимулирующая активность, микромицет Mortierella polycephala, полиненасыщенные жирные кислоты, эпифитные вещества кутикулярного слоя растительного сырья

В состав экстрактивных веществ биомассы микромицета Mortierella polycephala входят высшие жирные кислоты, в основном полиненасыщенные, в том числе эйкозатетраеновая и эйкозапентаеновая, обладающие иммуностимулирующей активностью в отношении высших растений.

Установлено, что в составе эфирных масел плодов и эпифитных веществ кутикулярного слоя высших растений отсутствуют вещества, способные подавить или ингибировать данный вид активности названных кислот. В итоге нанесенное на поверхность плодов покрытие не только предохраняет плоды от высыхания и обладает антисептическими свойствами, но и стимулирует защитные силы реакции плодов, что увеличивает срок их хранения за счет снижения вероятности микробиальной порчи при вторичной контаминации.

Сухую биомассу микромицета Mortierella polycephala экстрагируют неполярным экстрагентом, например, двуокисью углерода или гексаном, в сверхкритическом состоянии. Полученную мисцеллу смешивают с эфирными маслами таких же плодов, что и обрабатываемые, и эпифитными веществами кутикулярного слоя любого растительного сырья. Полученную смесь направляют на нанесение защитного покрытия на поверхность плодов.

Для обеспечения равномерного нанесения покрытия на поверхность обрабатываемых плодов параметры среды носителя снижают ниже критических. Это приводит к конденсации смеси эпифитных веществ кутикулярного слоя растительного сырья, эфирных масел и экстрактивных веществ микромицета Mortierella polycephala на поверхности обрабатываемых плодов.

Эпифитные вещества кутикулярного слоя растительного сырья замедляют окисление и испарение эфирных масел и окисление полиненасыщенных жирных кислот, входящих в состав экстрактивных веществ биомассы микромицета Mortierella polycephala. Эфирные масла нейтрализуют слабо выраженный грибной запах и вкус экстрактивных веществ биомассы микромицета Mortierella polycephala. Полиненасыщенные жирные кислоты экстрактивных веществ биомассы микромицета Mortierella polycephala замедляют окисление эфирных масел в составе покрытия и красящих веществ в поверхностных слоях плодов.

Пример 1. Сухую биомассу микромицета Mortierella polycephala экстрагируют сверхкритической двуокисью углерода и отделяют мисцеллу без изменения параметров экстрагента. Апельсины моют, подсушивают и обрабатывают полученной мисцеллой с добавлением апельсиновых эфирного масла и эпифитных веществ кутикулярного слоя. Опытная партия апельсинов по сравнению с контрольной сохраняет товарный вид на 20% дольше, потери от микробиальной порчи в течение 4 месяцев хранения сокращены в 3 раза.

Пример 2. Вишни обрабатывают аналогично примеру 1, но с использованием гексана и эпифитных веществ кутикулярного слоя шпината. Срок сохранения товарного вида опытной партии вишни увеличен в 2 раза, потери от микробиальной порчи в течение месячного срока хранения в модифицированной газовой среде снижены в 1,5 раза.

Таким образом, можно повысить надежность защиты плодов от микробиальной порчи и увеличить сроки их хранения, применяя обработку препаратом из микромицета Mortierella polycephala.

Литература

1. *Биохимия растительного сырья/ В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова и др.- М: Колос, 1999.- 276 с.*
2. *Медведев С.С. Физиология растений. – Изд-во: BHV-Петербург, 2015.- 512 с.*
3. *Eroshin V.K., Dedyukina E.G. Effect of lipids from Mortierella hygrophila on plant resistance to phytopathogens // World J. of Mikrobiol.& Biotechnol. 2002.-Vol.18.-P.165-167*

UDK 573.6.086.83 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-304-306

APPLICATION OF THE PREPARATION FROM MICROSCOPIC FUNGI IN THE TECHNOLOGY OF FRUIT PROCESSING BEFORE LAYING FOR STORAGE

Grigorevskaya I.I.[1], **Yushina E.A.**[2]

[1] *Academy of the State Fire Service EMERCOM of Russia; Russian Federation,*
129366, Moscow, Boris Galushkin street, 4

[2] *Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Moscow State University of Food Production",*
Moscow, Russia
115080, Moscow, Volokolamsk highway, 11
e-mail: irina-i-05@list.ru

The use of the preparation from the biomass of the micromycete Mortierella polycephala provides an increase in the reliability of protection of fruits from microbial spoilage and an increase in the shelf life of fruits.

Key words: immunostimulating activity, micromycete Mortierella polycephala, polyunsaturated fatty acids, epiphytic substances of the cuticle layer of plant raw materials.

The composition of extractive substances of the biomass of the micromycete Mortierella polycephala includes higher fatty acids, mainly polyunsaturated, including eicosatetraenoic and eicosapentaenoic, which have immunostimulating activity against higher plants.

It was found that the composition of essential oils of fruits and epiphytic substances of the cuticle layer of higher plants does not contain substances that can suppress or inhibit this type of activity of these acids. As a result, the coating applied to the surface of the fruit not only protects the fruit from drying out and has antiseptic properties, but also stimulates the protective forces of the reaction of the fruit, which increases their shelf life by reducing the likelihood of microbial spoilage during secondary contamination.

The dry biomass of the micromycete Mortierella polycephala is extracted with a non-polar extractant, for example, carbon dioxide or hexane, in a supercritical state. The resulting miscella is mixed with essential oils of the same fruits as the processed ones, and epiphytic substances of the cuticle layer of any plant raw materials. The resulting mixture is directed to apply a protective coating on the surface of the fruit.

To ensure uniform coating on the surface of the processed fruits, the parameters of the carrier medium are reduced below the critical ones. This leads to condensation of a mixture of epiphytic substances of the cuticle layer of plant raw materials, essential oils and extractive substances of the micromycete Mortierella polycephala on the surface of the processed fruits.

Epiphytic substances of the cuticular layer of plant raw materials slow down the oxidation and evaporation of essential oils and the oxidation of polyunsaturated fatty acids that are part of the extractive substances of the biomass of the micromycete Mortierella polycephala. Essential oils neutralize the weakly expressed mushroom smell and taste of extractive substances of the biomass of the micromycete Mortierella polycephala. Polyunsaturated fatty acids of extractive substances of the biomass of the micromycete Mortierella polycephala slow down the oxidation of essential oils in the coating and coloring substances in the surface layers of fruits.

Example 1. The dry biomass of the micromycete Mortierella polycephala is extracted with supercritical carbon dioxide and the miscella is separated without changing the extractant parameters. Oranges are washed, dried and treated with the resulting miscella with the addition of orange essential oil and epiphytic substances of the cuticle layer. The experimental batch of oranges, compared with the control one, retains its presentation by 20% longer, losses from microbial spoilage during 4 months of storage are reduced by 3 times.

Example 2. Cherries are processed similarly to Example 1, but using hexane and epiphytic substances of the cuticle layer of spinach. The period of preservation of the commercial appearance of the experimental batch of cherries has been increased by 2 times, losses from microbial spoilage during the monthly storage period in a modified gas environment have been reduced by 1.5 times.

Thus, it is possible to increase the reliability of protecting fruits from microbial spoilage and increase their shelf life by using a preparation from the micromycete Mortierella polycephala.

References

1. Biochemistry of plant raw materials/ V. G. Shcherbakov, V. G. Lobanov, T. N. Prudnikova, etc. - M: Kolos, 1999. – P.276.

2. Medvedev S. S. Plant physiology. - Publishing house: BHV-Petersburg, 2015. – P.512.

3. Eroshin V.K., Dedyukina E.G. Effect of lipids from Mortierella hygrophila on plant resistance to phytopathogens // World J. of Mikrobiol.& Biotechnol. 2002.-Vol.18.-P.165-167.

УДК 663.5 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-306-308

КОМПЛЕКС ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ КОНВЕРСИИ БИОКОМПОНЕНТОВ КУРАГИ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ПИЩЕВЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ ДЛЯ СПИРТНЫХ НАПИТКОВ

Головачёва Н.Е., Абрамова И.М., Морозова С.С., Галлямова Л.П.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия
111033, г. Москва, ул. Самокатная, д.4Б
e-mail: golovacheva.otlvp@mail.ru

Показана эффективность использования ферментных препаратов пектолитического действия - Фруктоцим П6-Л и грибной целлюлазы - Брюзайм BGX для биокатализа высокомолекулярных веществ мезги кураги при приготовлении пищевых ингредиентов (спиртованных соков и морсов) для спиртных напитков.

Ключевые слова: ферментные препараты, пектиновые вещества, общие фенольные вещества, антоцианы, антиоксидантная активность, мутность

Плоды абрикоса сушеного обладают богатым химических составом, содержащим редкие микроэлементы, витамины и биологически активные вещества, что перспективно для получения пищевых ингредиентов для спиртных напитков – спиртованных соков и морсов с высокими физико-химическими показателями и обладающими высокой биологической ценностью [1, 2].

Одним из наиболее перспективных методов интенсификации процесса приготовления соков и морсов является применение ферментных препаратов (ФП), способствующих эффективной конверсии биокомпонентов кураги [3].

Анализ литературных данных и результаты исследования подтверждают высокое содержание пектиновых веществ в кураге, наличие целлюлозы и гемицеллюлозы, поэтому возникает необходимость внесения в водный настой измельченной кураги (1:2) комплекса ферментов, обладающих субстратной специфичностью по отношению к полисахаридам кураги. Для обработки сырья использовали комплексные пектолитические ФП «Фруктоцим П6–Л» и «Фруктоцим Колор» и ферментный препарат «Брюзайм BGX», обладающий высокой активностью ферментов, расщепляющих некрахмалистые полисахариды. Подбор оптимального комплекса ФП и их дозировки производили путем постановки многофакторного эксперимента.

Действие мультиэнзимных композиций ФП на мезгу кураги способствовало улучшению реологических показателей водного настоя по сравнению с контролем (без обработки ФП): в опытных вариантах выход

настоя-самотека увеличился в 1,7-4,7 раз, общий выход настоя - в 3-3,5 раз; кинематическая вязкость снизилась почти в 2 раза. Лучшие реологические показатели были отмечены для композиции ФП Фруктоцим П 6Л (150 см^3/т) - Брюзайм BGX (100 см^3/т). Биокатализ высокомолекулярных соединений, прежде всего пектиновых веществ, способствовал снижению мутности, увеличению общего экстракта настоя.

Гидролиз клеточных стенок кураги способствовал высвобождению красящих веществ (антоцианов), что привело к увеличению интенсивности окраски, увеличению содержания общих фенольных веществ на 10-15% и антиоксидантной активности на 5-8%.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о эффективности применения мультиэнзимной композиции ФП пектолитического и целлюлитического действия для эффективной конверсии биокомпонентов кураги при получении пищевых ингредиентов для спиртных напитков.

Исследования проведены за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук (тема №0529-2019-0057).

Литература

1. *Fratianni, F., Ombra, M.N., d'Acierno, A., Cipriano, L., Nazzaro, F.Current. Apricots: biochemistry and functional properties (Review)//Opinion in Food Science. 2018. №2. Vol. 19. P. 23-29.*
2. *Химический состав российских пищевых продуктов: Справочник /Под ред. Скурихина И. М., Тутельяна В. А. - М.: ДеЛи принт, 2002. - 236 с.*
3. *Римарева Л.В., Серба Е.М., Соколова Е.Н., Борщева Ю.А., Игнатова Н.И. Ферментные препараты и биокаталитические процессы в пищевой промышленности // Вопросы питания. - 2017.- Т. 86.- № 5.- С. 63–74.*

UDC 663.5 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-306-308

COMPLEX OF ENZYMES FOR EFFICIENT CONVERSION OF DRIED APRICOT BIOCOMPONENTS IN THE PRODUCTION OF FOOD INGREDIENTS FOR ALCOHOLIC BEVERAGES

Golovacheva N.E., Abramova I.M., Morozova S.S., Gallyamova L.P.

Russian Scientific Research Institute of Food Biotechnology – Branch of Federal State Budget Institution of Science Federal Research Center of Food and Biotechnology
111033, Moscow, Samokatnaya str., h. 4B
e-mail: golovacheva.otlvp@mail.ru

The effectiveness of the use of pectolytic enzyme preparations - Fructocim P6L and fungal cellulase - Bruzaym BGX for biocatalysis of high-molecular substances of dried apricot pulp in the preparation of food ingredients (alcoholic juices and fruit drinks) for alcoholic beverages is shown.

Keywords: enzyme preparations, pectin substances, color intensity, total phenolic substances, anthocyanins, antioxidant activity, turbidity.

Dried apricot fruits have a rich chemical composition containing rare trace elements, vitamins and biologically active substances, which is promising for obtaining food ingredients for alcoholic beverages – alcoholic juices and fruit drinks with high physical and chemical parameters and having a high biological value [1, 2].

One of the most promising methods of intensifying the process of preparing juices and fruit drinks is the use of enzyme preparations (EP) that promote the effective conversion of dried apricot biocomponents [3].

The analysis of the literature data and the results of the study confirm the high content of pectin substances in dried apricots, the presence of cellulose and hemicellulose, so there is a need to add a complex of enzymes with substrate specificity in relation to dried apricot polysaccharides to the water infusion of crushed dried apricots (1:2). Complex pectolytic enzymes "Fructocim P6–L" and "Fructocim Color" and the enzyme preparation "Bruseim BGX", which has a high activity of enzymes that break down non-starchy polysaccharides, were used for processing raw materials. The selection of the optimal complex of EP and their dosage was carried out by setting up a multifactorial experiment.

The effect of multienzyme compositions of EP on dried apricot pulp contributed to the improvement of the rheological parameters of the water infusion in comparison with the control (without EP treatment): in the

experimental versions, the yield of the infusion-gravity increased by 1.7-4.7 times,the total yield of the infusion - by 3-3.5 times; the kinematic viscosity decreased by almost 2 times. The best rheological parameters were noted for the composition of Fructocim P 6L (150 cm^3/t) - Brusaim BGX (100 cm^3/t). Biocatalysis of high-molecular compounds, primarily pectin substances, contributed to a decrease in turbidity, an increase in the total extract of the infusion.

Hydrolysis of the cell walls of dried apricots contributed to the release of coloring substances (anthocyanins), which led to an increase in the intensity of coloring, an increase in the content of total phenolic substances by 10-15% and antioxidant activity by 5-8%.

The results obtained allow us to conclude about the effectiveness of the use of a multi-enzyme composition of EP of pectolytic and cellulitic action for the effective conversion of dried apricot biocomponents in the production of food ingredients for alcoholic beverages.

The research was carried out at the expense of a grant for the implementation of a state task within the framework of the Program of Fundamental Scientific Research of the State Academies of Sciences (topic No. 0529-2019-0057).

References

1. *Fratianni, F., Ombra, M.N., d'Acierno, A., Cipriano, L., Nazzaro, F.Current. Apricots: biochemistry and functional properties (Review)// Opinion in Food Science. 2018. №2. Vol. 19. P. 23-29.*
2. *Chemical composition of Russian food products: Handbook / ed. Corresponding Skurikhin I. M., Tutelyan V. A. - M.: Delhi print, 2002. - 236 p.*
3. *Rimareva L. V., Serba E. M., Sokolova E. N., Borshcheva Yu. A., Ignatova N. I. Enzyme preparations and biocatalytic processes in the food industry// Nutrition issues. - 2017. -Vol. 86.-№ 5. - pp. 63-74.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-308-310

РАЗРАБОТКА ИММУНОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПОДЛИННОСТИ И СОСТАВА МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ

Жердев А.В., Зверева Е.А., Гендриксон О.Д., Поправко Д.С., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33
e-mail: zherdev@inbi.ras.ru

Разработаны иммунохроматографические тест-системы, способы быстрой пробоподготовки и тестирования состава мясных продуктов, обеспечивающие выявление и оценку содержания мышечной ткани разных групп животных. Показано, что технологические процессы ферментативной и термообработки не препятствуют селективному выявлению биомаркеров.

Ключевые слова: мясопродукты, идентификация сырья, контроль состава пищевых продуктов, видоспецифичные биомаркеры, тест-методы, иммунохроматография

Существующие методы контроля состава мясных пищевых продуктов характеризуются значительной стоимостью тестирования и большими временными интервалами между пробоотбором и получением результатов, а доступные экспресс-тесты для этих целей ограничены минимальным числом контролируемых компонентов. В связи с этим задачей проведенных работ было создание иммунохроматографических тест-систем разной специфичности и оценка их эффективности при контроле исходного сырья и конечных пищевых мясопродуктов.

Рассмотрены биомаркеры, распознаваемые антителами при проведении тестирования. С учетом особенностей используемого сырья и технологических процессов его обработки в качестве контролируемых белков были выбраны скелетный тропонин I, миоглобин и иммуноглобулины. Для иммунохроматографического тестирования мясных продуктов разработана простая пробоподготовка, включающая гомогенизацию проб, экстракцию биомаркера в водно-солевой среде и центрифугирование. При определении термостабильных белков дополнительно проводилась быстрая – 2-3 мин. – тепловая денатурация неспецифических белковых компонентов матрикса пробы.

Разработана тест-система, которая специфически выявляла скелетный тропонин I в пробах мяса млекопитающих (корова, овца, свинья, лошадь), давая отрицательные результаты для тропонина I птиц (курица,

индейка). С помощью данного теста достоверно количественно контролируется, например, наличие добавок говядины в курином фарше, начиная с 1%-ного уровня.

Иммунохроматографическая тест-система на миоглобин специфически выявляла биомаркер в мясе свиньи, отличая его от миоглобина других видов млекопитающих и птиц. Проведена характеристика экстрактов из фаршей, полученных для смесей говядины и свинины. Показано, что 0.01% содержание свинины достаточно для ее достоверного выявления.

На основе антител против иммуноглобулинов разработаны тест-системы для детекции свинины и куриного мяса в мясных смесях и мясопродуктах. Так, в фарше из говядины присутствие куриного мяса выявляется, начиная с его 0.06% содержания.

Охарактеризовано совмещение иммунохроматографии с выявлением видоспецифических генетических идентификаторов мясного сырья методом изотермической амплификации. Рассмотрены возможности количественной оценки содержания контролируемого сырья на основании видеоцифровой регистрации результатов иммунохроматографии.

Эффективность тест-систем подтверждена их испытаниями на примерах мясных продуктов известного состава, подготовленных и предоставленных ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН. Полученные результаты позволяют рассматривать разработанные тест-системы как эффективное средство проверки аутентичности и заявленного состава мясных продуктов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 19-16-00108).

UDC 57.083.3 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-308-310

DEVELOPMENT OF IMMUNOCHEMICAL SYSTEMS TO CONTROL AUTHENTICITY AND COMPOSITION OF MEAT PRODUCTS

Zherdev A.V., Zvereva E.A., Hendrickson O.D., Popravko D.S., Dzantiev B.B.

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119071 Moscow, Leninsky prospect 33
e-mail: zherdev@inbi.ras.ru

Immunochromatographic test systems with rapid sample preparation have been developed for testing the composition of meat products, which ensure the identification and assessment of the content of muscle tissues from different groups of animals. It was shown that the technological processes of enzymatic and heat treatment did not impair the selective detection of biomarkers.

Key words: meat products, identification of raw materials, control of the composition of food products, species-specific biomarkers, test methods, immunochromatography

The methods for controlling the composition of meat food products are characterized by significant costs and long intervals between sampling and obtaining results, whereas the available rapid tests for these purposes are limited by the minimum number of controlled components. In this regard, the task of the implemented work was the development of immunochromatographic test systems of different specificity and the assessment of their effectiveness in the control of raw materials and final meat food products.

Biomarkers recognized by antibodies in the course of the testing were considered. Taking into account the characteristics of the raw materials used and technologies of their processing, skeletal troponin I, myoglobin, and immunoglobulins were chosen as controlled proteins. For immunochromatographic testing of meat products, a simple sample preparation has been developed, including homogenization, extraction of a biomarker in water/salt medium and centrifugation. For detection of thermostable proteins, rapid (2-3 min) thermal denaturation of nonspecific protein components of the sample matrix was additionally carried out.

The test system was developed that specifically detected skeletal troponin I in mammalian meat (cow, sheep, pig, horse), giving negative results for troponin I of birds (chicken, turkey). With this test system, for example, the presence of beef additives in minced chicken is reliably quantitatively controlled, starting at the 1% level.

The immunochromatographic test system for myoglobin specifically revealed this biomarker in pig meat, distinguishing it from the myoglobin of other mammalian and avian species. Characterization of minced meat extracts obtained for mixtures of beef and pork was carried out. It was shown that 0.01% content of pork is sufficient for its reliable detection.

On the basis of antibodies against immunoglobulins, test systems have been developed for the detection of pork and chicken meat in raw mixtures and final products. So, in minced beef, the presence of chicken meat is detected, starting from its 0.06% content.

The combination of immunochromatography with the detection of species-specific genetic identifiers of meat by isothermal amplification was characterized. Quantitative assessment of the content of controlled compounds by video-digital recording of immunochromatographic results was considered.

The effectiveness of the test systems was confirmed by their approbation on meat products of known composition, manufactured and provided by the V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences. The results obtained make it possible to consider the developed test systems as effective means of verifying the authenticity and the declared composition of meat products.

This work was financially supported by the Russian Science Foundation (grant 19-16-00108).

УДК 637.344.8 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-310-312

ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОЛОКОСОДЕРЖАЩЕГО НАПИТКА С ГИДРОЛИЗАТОМ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ

Мельникова Е.И., Богданова Е.В.

ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия
394036 Россия, Воронеж, пр. Революции, д. 19, ek-v-b@yandex.ru

В экспериментах *in vivo* изучено влияние молокосодержащего напитка с гидролизатом сывороточных белков при его употреблении на уровень холестерина в живом организме.

Ключевые слова: гидролизат сывороточных белков, молокосодержащий напиток, снижение уровня холестерина, продукты для диетического питания.

Предложено применение гидролизата сывороточных белков со сниженной аллергенностью, полученного с помощью ферментных препаратов Promod 439L и Flavorpro 766MDP, в производстве молокосодержащего напитка. Гидролизат является источником короткоцепочечных пептидов, которые быстрее усваиваются в желудочно-кишечном тракте и способны оказывать определенное физиологическое воздействие на организм человека [1].

Эффективность влияния пептидов, содержащихся в гидролизате сывороточных белков, на уровень холестерина в живом организме при употреблении полученного продукта была установлена в экспериментах *in vivo*, которые проводили в течение 14 дней на белых беспородных мышах в возрасте 14 дней. Для проведения эксперимента животные были случайным образом разделены на 3 группы по 15 особей. Интактные животные (группа 1) получали стандартный рацион (гранулированный корм ПК-120-1 (ООО "Лабораторснаб", Россия)); животные 2 группы получали рацион с частичной заменой (не более 20 %) основного рациона питьевым молоком; животные 3 группы получали рацион с частичной заменой (не более 20 %) основного рациона экспериментальным молокосодержащим напитком. Разработанный продукт вводился внутрижелудочно с использованием атравматичного зонда.

В процессе эксперимента ежедневно определяли массу тела мышей в каждой группе, на основании полученных результатов установлена величина прироста относительно первичных данных. Кровь, взятую из хвостовой вены перед началом эксперимента у животных в возрасте 2-х недель, на 14-й день эксперимента и по его окончании, исследовали на холестерин энзиматическим колориметрическим методом [2].

Таблица – Динамика изменения уровня холестерина в крови лабораторных мышей в ходе эксперимента, ммоль/л

Продолжительность эксперимента, сут.	№ 1 (интакт)	№ 2 (контроль)	№ 3 (эксперимент)
Холестерин, ммоль/л			
0 (начало)	2,1±0,15	2,1±0,14	2,1±0,13
14	2,3±0,14	2,2±0,14	2,1±0,12

Сохранность лабораторных животных за период клинических испытаний в 3-х экспериментальных группах составила 100 %. Развитие всех животных проходило практически с равной интенсивностью без видимых отклонений, прирост массы тела мышей составил 33,3 % к первоначальному. Уровень холестерина (таблица) на 14-й день эксперимента у животных в группе 1 превышал физиологическую норму (2,2±0,10 ммоль/л) на 9,5 %.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что увеличение уровня холестерина в крови подопытных животных в ходе употребления ими разработанного напитка не наблюдалось. Работа осуществлялась в рамках гранта Президента РФ на 2020 – 2021 гг. для молодых ученых – кандидатов наук, соглашение № 075-15-2020-322 (МК-1267.2020.11).

Литература

1. *Коржов Р.П., Пономарёв А.Н., Мельникова Е.И., Богданова Е.В. Подбор заквасочных культур для кефирного продукта со сниженной аллергенностью // Молочная промышленность. – 2015. – № 4. – С. 30 – 31.*
2. *Макарова В. Г. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. – СПБ.: Изд-во «ЛЕМА», 2013. –116 с.*

UDC 637.344.8 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-310-312

HYPOLIPIDEMIC PROPERTIES OF A MILK-CONTAINING DRINK SUPPLEMENTED WITH WHEY PROTEIN HYDROLYSATE

E.I. Melnikova, E.V. Bogdanova

FSBEI HE Voronezh State University of Engineering Technologies,
Voronezh, Russia
19, Revolution Av., Voronezh, 394036, Russia, ek-v-b@yandex.ru

The effect of a milk-containing drink supplemented with whey protein hydrolysate on the level of cholesterol in a living organism during its consumption was studied *in vivo*.

Keywords: whey protein hydrolysate, milk-containing drink, cholesterol reduction, products for dietary nutrition.

The usage of whey protein hydrolysate with reduced allergenicity, obtained with the help of enzymes Promod 439L and Flavorpro 766MDP, was proposed for the production of a milk-containing drink. Hydrolysate is a source of short-chain peptides that digest faster in the gastrointestinal tract and are capable of having a certain physiological effect on the human body [1].

The effect of peptides in whey protein hydrolysate on cholesterol level in a living organism when using the obtained product was identified with *in vivo* experiments conducted for 14 days on white outbred mice aged 14 days. The animals were randomly divided into 3 groups of 15 individuals to conduct the experiment. Intact animals (group 1) received a standard diet (granular feed PK-120-1 (LLC "Laboratorsnab", Russia)). Animals of group 2 received a diet with a partial replacement (no more than 20 %) of the main diet with drinking milk. Animals of group 3 were fed a diet with a partial replacement (no more than 20%) of the main diet with an experimental milk-containing drink. The developed product was injected intragastrically using an atraumatic probe.

Table – Dynamics of changes in cholesterol level in the blood of laboratory mice during the experiment, mmol/l

Duration of test run, days	group 1 (intact animals)	group 2 (control group)	group 3 (experimental group)
Cholesterol, mmol/l			
0 (start)	2.1±0.15	2.1±0.14	2.1±0.13
14	2.3±0.14	2.2±0.14	2.1±0.12

During the experiment, the body weight of mice was determined in each group daily, the gain figure relative to the primary data was identified based on the obtained results. Blood taken from the caudal vein before the start of the experiment in animals aged 2 weeks, on the 14th day of the experiment and at its end, was examined for cholesterol by the enzymatic colorimetric method [2].

The survival rate of laboratory animals during the period of clinical trials was 100% in all the three experimental groups. All the animals were developing with almost equal intensity and without visible deviations, the gain figure of mice was 33.3 % compared to the initial one. The cholesterol level in the animals (table) on the 14th day of the experiment in group 1 exceeded the physiological range (2.2±0.10 mmol/l) by 9.5%.

Based on the obtained data, it can be concluded that the level of cholesterol in the blood of experimental animals did not increase during the use of the developed drink. The work was carried out within the framework of the grant of the President of the Russian Federation for 2020-2021 for Young Researchers – PhDs in Sciences, Agreement No. 075-15-2020-322 (МК-1267.2020.11).

References

1. *Korzhov R. P., Ponomarev A. N., Melnikova E. I., Bogdanova E. V. Selection of starter cultures for kefir products with reduced allergenicity // Dairy industry. – 2015. – No. 4. – p. 30 – 31.*
2. *Makarova V. G. Physiological, biochemical and biometric indicators of the norm of experimental animals. – St. Petersburg: Publishing house "LEMA", 2013. – 116 p.*

УДК: 664; 613.292 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-312-314

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОГО ПИЩЕВОГО ИНГРЕДИЕНТА: ИСТОЧНИКА ФИТОЭКДИСТЕРОИДОВ И ФЛАВОНОИДОВ ИЗ ЗЕРНА КИНОА

Н.А.Петров, С.Н.Зорин, Н.А.Бирюлина, Ю.С.Сидорова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Россия, 109240, Москва, Устьинский проезд, 2/14, petrov-nikita-y@mail.ru, +79037948714

Разработан новый пищевой ингредиент – источник фитоэкдистероидов и флавоноидов из зерна киноа. Проведена физиолого-биохимическая оценка его эффективности в условиях хронического иммобилизационного стресса и разовой истощающей нагрузки бегом. Показан выраженный адаптогенный эффект разработанного пищевого ингредиента.

Ключевые слова: киноа, 20-гидроксиэкдизон, флавоноиды, иммобилизация, истощающая физическая нагрузка

Одним из факторов определяющих здоровье и устойчивость организма человека к стрессорным воздействиям, является питание, адекватное не только к энергетическим тратам, но и к потребностям в биологически активных веществах (БАВ) адаптогенной направленности. Что может быть обеспечено включением в состав специализированных пищевых продуктов ингредиентов с доказанными адаптогенными свойствами. Пищевой ингредиент (ПИ) получали путем сорбции БАВ из экстракта зерна киноа на сухом коагулированном яичном белке. Содержание 20-гидроксиэкдизона в полученном ингредиенте составило 3,4±0,3 мг/г, содержание флавоноидов – 14,1±0,1 мг/г. Эксперимент проведен с использованием 72 крыс-самцов линии Wistar с исходной массой тела 130±5г. Животных разделили на 6 групп (n=12): КОНТРОЛЬ, ИММО, ИММО+ПИ, КОНТРОЛЬ, БЕГ, БЕГ+ПИ. В рацион крыс групп ИММО+ПИ и БЕГ+ПИ вносили ПИ в количестве 0,6%. Животные групп ИММО и ИММО+ПИ на протяжении 35 суток подвергались 40-минутной иммобилизации; на 35 сутки истощающей иммобилизации 3 часа. Животные групп БЕГ и БЕГ+ПИ подвергались истощающей физической нагрузке на беговой дорожке. Сразу после истощающего стресса животных помещали в обменные клетки для сбора суточной мочи. Через 24 ч (36 сут.) крыс выводили из эксперимента путем декапитации под легким эфирным наркозом. Содержание катехоламинов (норадреналина, адреналина и дофамина) и простагландина Е2 определяли в моче. *Иммобилизационный стресс.* Среднее кумулятивное потребление корма стрессированными животными групп ИММО (17,2±0,3 г/сут/крыса) и ИММО+ПИ (16,9±0,2 г/сут/крыса) было достоверно ($p<0,05$) ниже по сравнению с потреблением корма группы КОНТРОЛЬ (19,4±0,3 г/сутки/крыса). Прирост массы тела животных групп ИММО и ИММО+ПИ был достоверно ($p<0,01$) ниже прироста крыс группы КОНТРОЛЬ. Суточная экскреция норадреналина (838±180 нг/сутки) и адреналина (1445±255 нг/сутки) с мочой у животных группы ИММО, была

достоверно(p<0,05) выше по сравнению с животными группы КОНТРОЛЬ (411±72 нг/сутки, 822±104 нг/сутки, соответственно). Введение в рацион стрессированных животных группы ИММО+ПИ пищевого ингредиента приводило к достоверному снижению в 2,8 раза экскреции с мочой норадреналина (501±80 нг/сутки) и более чем в 2,3 раза экскреции с мочой адреналина (358±75 нг/сутки) по сравнению с крысами группы ИММО. Не было выявлено отличий в суточной экскреции простагландина Е2 между всеми сравниваемыми группами. Истощающая физическая нагрузка. Суточная экскреция простагландина Е2 с мочой животных стрессированной группы БЕГ достоверно (p<0,05) более чем в 1,5 раза снизилась по сравнению с показателем животных группы КОНТРОЛЬ (6,7±1,8 нг/сутки и 10,7±1,4 нг/сутки, соответственно). Ведение в рацион животных пищевого ингредиента приводило к торможению падения его экскреции с мочой до уровня крыс группы Контроль (8,1±1,6 нг/сутки). Суточная экскреция катехоламинов с мочой: показано достоверное (p<0,05) увеличение экскреции с мочой дофамина, адреналина и норадреналина (в 1,5, 1,6 и 1,5 раза) у стрессированных животных группы ИММО+ПИ, по сравнению с экскрецией у крыс группы КОНТРОЛЬ.

Показано, что экскреция с мочой основных биомаркеров стресса катехоламинов и простагландина различается в зависимости от вида стресса. Влияние пищевого ингредиента на стресс-систему также различалось при различном стрессорном воздействии. В случае хронического иммобилизационного стресса введение в рацион животных пищевого ингредиента приводило к нормализации показателей катехоламинов и простогландина до уровня интактных животных. При истощающей физической нагрузке фитоэкдистероиды и флавоноиды выступали в качестве прострессоров, активизируя стресс - систему организма, что подтверждается достоверным увеличением уровня катехоламинов.

Финансирование: Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 19-16-00107.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-312-314

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF A NEW FOOD INGREDIENT: A SOURCE OF PHYTOECDYSTEROIDS AND FLAVONOIDS FROM QUINOA GRAIN

N.Petrov, S.Zorin, N.Biryulina, Y.Sidorova

Federal State Budgetary Organization of Science "Federal research centre of nutrition, biotechnology and food safety", Russia, 109240, Moscow, Ustinsky proezd, 2/14

A new food ingredient has been developed - a source of phytoecdysteroids and flavonoids from quinoa grain. A physiological and biochemical assessment of its effectiveness under conditions of chronic immobilization stress and a single e exhausting physical activity was carried out. A pronounced adaptogenic effect of the developed food ingredient was shown.

Key words: quinoa,20- hydroxyecdysone, flavonoids, immobilization, exhausting physical activity

One of the factors that determine the health and resistance of the human to stressful influences is nutrition that is adequate not only to energy expenditures, but also to the needs of biologically active substances (BAS) of adaptogenic action. This can be achieved by using ingredients with proven adaptogenic properties. Food ingredient (FI) was obtained by sorption of BAS from quinoa grain extract on dry coagulated egg white. The content of 20-hydroxyecdysone in the obtained ingredient was 3.4±0.3 mg/g, the content of flavonoids was 14.1±0.1 mg / g. The experiment was carried out using 72 male Wistar rats with an initial body weight of 130±5g. The animals were divided into 6 groups (n=12): CONTROL, IMMO, IMMO+FI, CONTROL, RUN, RUN+FI. The diet of the IMMO+FI and REG+FI rats was supplemented with FI in an amount of 0.6%. Animals of the IMMO and IMMO+FI groups were immobilized for 34 days; on the 35th was the exhausting immobilization for 3 hours. Animals of the RUN and RUN+FI groups were subjected to exhausting physical activity on a treadmill (35th day). Immediately after exhausting stress, the animals were placed in exchange cages to collect daily urine. After 24 h (36 days), the rats were removed from the experiment by decapitation under light ether anesthesia. The content of catecholamines (norepinephrine, adrenaline, and dopamine) and prostaglandin E2 was determined in urine. *Immobilization stress.* The average cumulative feed intake by stressed animals of the IMMO groups (17.2±0.3 g/day/rat) and IMMO FI (16.9±0.2 g/day/rat) was significantly (p <0.05) lower compared to the CONTROL group (19.4±0.3 g/day/rat). The body weight of the IMMO and IMMO+FI animals was significantly (p<0.01) lower than the body weight of the CONTROL rats. The daily excretion of norepinephrine (838±180 ng/day) and adrenaline (1445±255 ng/day) with

urine in IMMO group was significantly (p <0.05) higher than in the CONTROL group (411±72 ng/day, 822±104 ng/day, respectively). Addition of a food ingredient into the diet of stressed IMMO+FI animals led to the significant 2.8-fold decrease in urinary excretion of norepinephrine (501±80 ng / day) and more than 2.3-fold urinary excretion of adrenaline (358 ± 75 ng / day). day) compared with IMMO group rats. There were no differences in the daily excretion of prostaglandin E2 between all compared groups. *Exhausting physical activity.* The daily excretion of prostaglandin E2 of animals from the stressed RUN group significantly (p<0.05) decreased by more than 1.5 times compared with that of the animals of the CONTROL group (6.7±1.8 ng/day and 10.7±1.4 ng/day, respectively). The consumption of food ingredient led to inhibition of the decrease in prostaglandin E2 excretion with urine to the level of Control (8.1±1.6 ng/day). Daily urinary excretion of catecholamines: a significant (p<0.05) increase in the urinary excretion of dopamine, adrenaline, and norepinephrine (1.5, 1.6, and 1.5 times) was shown in stressed animals of the IMMO+FI group, compared with excretion in CONTROL rats. This work was supported by a grant from the Russian Science Foundation No. 19-16-00107

It has been shown that urinary excretion of the main stress biomarkers, catecholamines and prostaglandin, differs depending on the type of stress. The effect of the food ingredient on the stress system also differed under different stressors. In the case of chronic immobilization stress, the introduction of a food ingredient into the diet of animals led to the normalization of catecholamines and prostaglandin E2 levels to the control level. During exhausting physical activity, phytoecdysteroids and flavonoids acted as prostressors, activating the stress system of the body, which is confirmed by a significant increase in the level of catecholamines.

Grant: This work was supported by a grant from the Russian Science Foundation No. 19-16-00107.

УДК 637.136: 637.146.33:637.344.8 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-314-316

НОВЫЕ ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ С ДРОЖЖАМИ-ПРОБИОТИКАМИ

Рябцева С. А., Храмцов А.Г., Сазанова С.Н.

ФГАОУ ВО Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия
355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, 1
e-mail: ryabtseva07@mail.ru

Альтернативой традиционным пробиотикам могут стать сахаромицетные дрожжи. Хорошо изучены полезные свойства *Saccharomyces boulardii*. Внесение этих дрожжей в пищевые продукты позволяет обогатить их функциональными ингредиентами. Разработан способ получения мороженого с дрожжами-пробиотиками.

Ключевые слова: пробиотики, *Saccharomyces boulardii*, пищевые продукты, мороженое

К актуальным проблемам биотехнологии относится получение функциональных пищевых продуктов, обогащенных пробиотиками. Традиционно применяемые с этой целью молочнокислые микроорганизмы и бифидобактерии должны сохраняться в течение всего срока годности в количестве не менее миллиона живых клеток в 1 г продукта, при этом не снижать его органолептические показатели и оказывать клинически доказанное положительное влияние на здоровье человека. В качестве альтернативы может быть рассмотрено применение новых видов пробиотиков небактериального происхождения.

К таким микроорганизмам относятся некоторые виды сахаромицетных грибов, среди которых наиболее известен вид *Saccharomyces boulardii*. Эти дрожжи хорошо изучены, в т.ч. на уровне клинических испытаний. Доказана антибактериальная и антитоксическая активность *S. boulardii*, благодаря чему их давно используют в медицине. *S. boulardii* имеют международный статус безопасности QPS, они рекомендованы в качестве пробиотической добавки для пищевых продуктов и кормов [1].

Свойства *S. boulardii* дают возможность обогатить пищевые продукты важными микронутриентами, в частности, витаминами группы В и антиоксидантами, стабилизировать pH и кислотность, стимулировать рост и повысить выживаемость стартерных пробиотических бактериальных культур. Известные разработки в области применения сахаромицет Буларди в пищевой промышленности основаны на ферментации растительного сырья (включая рисовые отруби, батат, сою, ячменный солод, различные овощные и фруктовые соки), ферментации молочного сырья (с получением новых видов кисломолочных напитков, сыров и мороженого), предотвращении микробной порчи и микрокапсулировании [2].

На кафедре прикладной биотехнологии СКФУ разработан способ получения нового вида пробиотического мороженого с *S. boulardii*, повышенной биологической ценностью и улучшенными качественными

показателями. Особенностью технологии является внесение дрожжей-пробиотиков в определенном количестве в смесь для мороженого после ее пастеризации, гомогенизации и охлаждения, после чего проводят созревание и ферментацию смеси в течение 8-12 часов с постоянным перемешиванием. К преимуществам мороженого с *S. boulardii* относится его пониженная калорийность, а также содержание витаминов группы В, антиоксидантов, повышенная хранимостпособность [3].

Литература

1. *Ricci A., at al. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 5: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2016 / A.Ricci, A.Allende, D.Bolton, M.Chemaly, at al. // EFSA Journal. 2017. №15. P.4366.*
2. *Рябцева С. А., Сазанова С. Н., Дубинина А.А. Saccharomyces boulardii как потенциальные пробиотики для инновационных пищевых продуктов// Современная наука и инновации. – 2019. -№2 (26). – С.138-151.*
3. *Способ получения мороженого / Патент РФ № 2736353 // Рябцева С.А., Сазанова С.Н., Храмцов А.Г., Анисимов Г.С., Ахмедова В.Р. Приор.24.01.20, опубл 16.11.2020, бюл. № 32.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-314-316

NEW FOOD PRODUCTS WITH PROBIOTIC YEAST

Ryabtseva S.A., Khramtsov A.G., Sazanova S.N.

FSAEI HE "North-Caucasus Federal University", Stavropol, Russia
355009, Stavropol, st. Pushkin, 1
e-mail: ryabtseva07@mail.ru

Saccharomycete yeast can be an alternative to traditional probiotics. The beneficial properties of *Saccharomyces boulardii* are well understood. By adding this yeast to food products, you can enrich them with functional ingredients. A method for producing ice cream with probiotic yeast has been developed.

Key words: probiotics, *Saccharomyces boulardii*, food, ice cream

One of the topical problems of biotechnology is the production of functional food products enriched with probiotics. Traditionally used for this purpose, lactic acid microorganisms and bifidobacteria should be preserved throughout the shelf life in an amount of at least a million live cells per 1 g of the product, while not spoilage of organoleptic characteristics and having a clinically proven positive effect on human health. As an alternative, the use of new types of probiotics of non-bacterial origin can be considered.

These microorganisms include some types of saccharomycete fungi, among which the most famous species is *Saccharomyces boulardii*. This yeast has been well studied, incl. at the level of clinical trials. The antibacterial and antitoxic activity of *S. boulardii* has been proven, due to which they have been used in medicine for a long time. *S. boulardii* has an international safety status QPS and is recommended as a probiotic supplement for food and feed [1].

The properties of *S. boulardii* make it possible to enrich food with important micronutrients, in particular, B vitamins and antioxidants, stabilize pH and acidity, stimulate growth and increase the survival rate of starter probiotic bacterial cultures. Known developments in the field of application of S. boulardii in the food industry are based on the fermentation of plant raw materials (including rice bran, sweet potato, soybeans, barley malt, various vegetable and fruit juices), fermentation of dairy raw materials (to obtain new types of fermented milk drinks, cheeses and ice cream), prevention of microbial spoilage and microencapsulation [2].

At the Department of Applied Biotechnology (NCFU), a method has been developed for obtaining a new type of probiotic ice cream with *S. boulardii*, increased biological value and improved quality indicators. A feature of the technology is the introduction of probiotic yeast in a certain amount into the ice cream mixture after pasteurization, homogenization and cooling, after which the mixture is ripened and fermented for 8-12 hours with constant stirring. The advantages of ice cream with *S. boulardii* include its reduced calorie content, as well as the content of B vitamins, antioxidants, and increased storage capacity [3].

References

1. *Ricci A., at al. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 5: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2016 / A. Ricci, A. Allende, D. Bolton, M. Chemaly, at al. // EFSA Journal. 2017. No. 15. R.4366.*

2. *Ryabtseva S. A., Sazanova S. N., Dubinina A. A. Saccharomyces boulardii as potential probiotics for innovative food products // Modern Science and Innovations. - 2019. -№2 (26). - S. 138-151.*
3. *Method for producing ice cream / RU Patent No. 2736353 // Ryabtseva SA, Sazanova SN, Khramtsov AG, Anisimov GS, Akhmedova VR. Prior, 24.01.20, publ. 16.11.2020, bul. No. 32.*

УДК 577.218. DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-316-317

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В РЕГУЛЯТОРНОЙ ОБЛАСТИ ОПЕРОНА ILVBNC НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ОПЕРОНА, АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА AHAS И ПРОДУКЦИЮ L-ВАЛИНА В ШТАММАХ CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM

Рябченко Л.Е.[1], **Леонова Т.Е.**[1], **Калинина Т.И.**[1], **Герасимова Т.В.**[1], **Титов И.И.**[2], **Яненко А.С.**[1]

[1] *Федеральное государственное бюджетное учреждение "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт" (НИЦ "Курчатовский институт" – ГосНИИгенетика), Москва, Россия*
117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1
[2] *Федеральный исследовательский центр "Институт цитологии и генетики СО РАН Национального исследовательского центра "Курчатовский институт", Новосибирск, Россия*
630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10
e-mail: tanpog@mail.ru

Точечная мутация в регуляторной области оперона *ilv*BNC ведет к усилению транскрипции генов оперона, повышению активности фермента AHAS и увеличению синтеза L-валина.

Ключевые слова: штаммы-продуценты аминокислот; L-валин; экспрессия оперона; терминатор и антитерминатор; аттенюаторный контроль транскрипции.

Современные штаммы-продуценты, используемые для промышленного производства L-аминокислот с разветвленной боковой цепью - BCAA (от англ. branched-chain amino acids), содержат комплекс изменений в геноме, обеспечивающих сверхпродукцию при росте на средах с сахарами. Для получения штаммов-продуцентов используют различные селекционные и генетические подходы, включая мутагенез, амплификацию отдельных или нескольких генов, усиление активности отдельных генов или их инактивацию. Известно, что гены биосинтеза BCAA (*ilv*B, *ilv*N и *ilv*C) в клетках *Corynebacterium* составляют единый оперон, активность которого подавляется валином, лейцином или изолейцином. Экспрессия генов оперона *ilv*BNC контролируется с участием регуляторной области - 292 нуклеотида, расположенной перед первым структурным геном оперона. Она кодирует лидерный пептид из 15 аминокислот и район, где возможно формирование вторичных структур – терминатора и антитерминатора, т.е. осуществляется аттенюаторный контроль транскрипции (1). В штамме-продуценте валина *C.glutamicum* VF, полученном мутагенезом, присутствует мутация $P_{ilvB\ G183A}$ — замена гуанина на аденин в позиции -183 перед старт кодоном гена ilvB. Введение ее в дикие штаммы *C.glutamicum* ATCC13032 и ATCC13869 ведет к увеличению синтеза валина в ½ - 4 раза в зависимости от штамма, увеличению активности ацетолактатсинтазы — фермента, кодируемого генами *ilv*BN, в 6,5 раз (2) и увеличению транскрипции генов *ilv*BN в 6-10 раз. Мы сконструировали штаммы на основе *C.glutamicum* ATCC13869, имеющие замены гуанина в данной позиции на другие нуклеотиды, а также штаммы, имеющие дополнительные замены нуклеотидов в этой области или делецию. Наибольший эффект на усиление экспрессии генов оперона и продукцию валина имеет замена гуанина на аденин или тиамин в позиции -183 перед структурным геном *ilv*B. Замена гуанина на цитозин в этой позиции, дополнительные мутации и делеция в этой области также приводят к усилению экспрессии оперона, но в меньшей степени.

Предполагается, что работа оперона *ilv*BNC регулируется по механизму аттенюации. Биоинформационный анализ регуляторной области данного оперона в родительском и мутантных штаммах свидетельствует, что полученные мутации оказывают влияние на вероятность формирования шпилечных структур (терминатор, антитерминатор), нарушая таким образом механизм аттенюации.

Литература

1. *Morbach S., Junger C., Sahmand H., Eggeling L. Attenuation control of ilvBNC in Corynebacterium glutamicum: evidence of leader peptide formation without the presence of a ribosome dinding site // Journal of Bioscience and Bioengineering. - 2000. - V.90, №5. – P.501-507.*

2. *Рябченко Л.Е., Герасимова Т.В., Леонова Т.Е., Калинина Т.И., Шереметьева М.Е., Ануфриев К.Э., Яненко А.С. Бактерия Corynebacterium glutamicum с повышенной способностью продуцировать L-валин и способ получения L-валина с использованием этой бактерии // Патент России № 2753996. 2021. Бюл. № 24.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-316-317

EFFECT OF MUTATIONS IN THE REGULATORY REGION OF OPERON ILVBNC ON EXPRESSION OF OPERON GENES, ACTIVITY OF THE ENZYME AHAS AND PRODUCTION OF L-VALINE IN CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM STRAINS

Ryabchenko L.E.[1], **Leonova T.E.**[1], **Kalinina T.I.**[1], **Gerasimova T.V.**[1], **Titov I.I.**[2], **Yanenko A.S.**[1]

[1] *State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Kurchatov Institute National Research Center (GOSNIIGENETIKA), Moscow, Russia*
117545 Moscow, 1st Doroznj pr., 1
[2] *Federal Research Center "Institute of Cytology and Genetics SB RAS of the National Research Center" Kurchatov Institute ", Novosibirsk, Russia*
630090, Novosibirsk, Ak. Lavrentieva, 10
e-mail: tanpog@mail.ru

A point mutation in the regulatory region of the *ilv*BNC operon leads to an increase in the transcription of the operon genes, an increase in the activity of the AHAS enzyme, and an increase in the synthesis of L-valine.

Key words: amino acid-producing strains; L-valine; operon expression; terminator and antiterminator; attenuation control of transcription.

Modern producer strains used for the industrial production of branched-chain amino acids (BCAA) contain a complex of changes in the genome that provide overproduction when grown on media with sugars. To obtain producer strains, various selection and genetic approaches are used, including mutagenesis, amplification of individual or several genes, enhancement of the activity of individual genes or their inactivation. It is known that the genes for BCAA biosynthesis (*ilv*B, *ilv*N, and *ilv*C) in *Corynebacterium* cells form a single operon, the activity of which is suppressed by valine, leucine, or isoleucine. The expression of genes of the *ilv*BNC operon is controlled with the participation of the regulatory region - 292 nucleotides, located in front of the first structural gene of the operon. It encodes a leader peptide -15 amino acids and a region where the formation of secondary structures - a terminator and an antiterminator - is possible, i.e. attenuation control of transcription is carried out (1). In the strain-producer of valine *C. glutamicum* VF, obtained by mutagenesis, there is a P_{ilvB}^{G183A} mutation - a substitution of guanine for adenine at position -183 before the start of the *ilv*B gene codon. Its introduction into wild strains of *C. glutamicum* ATCC13032 and ATCC13869 leads to an increase in valine synthesis by ½ - 4 times depending on the strain, an increase in the activity of acetolactate synthase, an enzyme encoded by the *ilv*BN genes, by a factor of 6.5 (2) and an increase in the transcription of the *ilv*BN genes in 6-10 times. We designed strains based on *C. glutamicum* ATCC13869 with guanine substitutions in this position for other nucleotides, as well as strains with additional nucleotide substitutions in this region or a deletion. Replacement of guanine for adenine or thiamine at position -183 in front of the *ilv*B structural gene has the greatest effect on enhancing operon gene expression and valine production. Substitution of guanine for cytosine in this position, additional mutations and deletions in this region also lead to increased expression of the operon, but to a lesser extent.

It is assumed that the *ilv*BNC operon is regulated by an attenuation mechanism. Bioinformatic analysis of the regulatory region of this operon in the wild type and mutant strains indicates that the obtained mutations affect the probability of the formation of hairpin structures (terminator, antiterminator), thereby disrupting the attenuation mechanism.

References

1. *Morbach S., Junger C., Sahmand H., Eggeling L. Attenuation control of ilvBNC in Corynebacterium glutamicum: evidence of leader peptide formation without the presence of a ribosome dinding site // Journal of Bioscience and Bioengineering. - 2000. - V.90, №5. – P.501-507.*

2. *Ryabchenko L.E, Gerasimova N.V., Leonova T.E., Kalinina T.I., Sheremeteva M.E., Anufriev K.E., Yanenko A.S. Bacterium Corynebacterium glutamicum with increased ability to produce valine and method for producing l-valine using this bacterium // RU № 2753996. 2021. Bull. № 24.*

УДК 579.64 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-318-320

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ ТРАНСКРИПЦИОННОГО РЕГУЛЯТОРА LRP ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПУТЕЙ БИОСИНТЕЗА ВАЛИНА В КЛЕТКАХ CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM

Самарин А.А., Дербиков Д.Д., Яненко А.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт" (НИЦ "Курчатовский институт" – ГосНИИгенетика, Москва, Россия
117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1
e-mail: ferenter@mail.ru

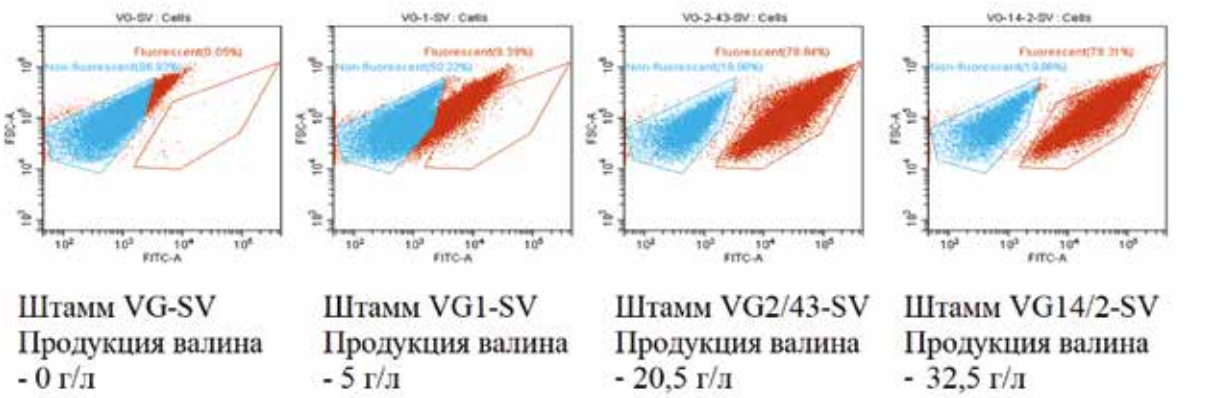
Получена конструкция биосенсора на основе гена Lrp, представляющая собой ген флуоресцентного белка, расположенный под промотором гена brnFE. Показано, что флуоресценция клеток *Corynebacterium glutamicum*, содержащих биосенсор, коррелирует с продукцией валина клетками и при его помощи возможно изучение путей биосинтеза валина.

Ключевые слова: валин; биосенсор; транскрипционный регулятор Lrp; *Corynebacterium glutamicum*.

Создание новых штаммов *Corynebacterium glutamicum*-продуцентов валина при помощи ненаправленного мутагенеза требует эффективного метода анализа множества получаемых вариантов. Таким методом может стать использование валинового биосенсора.

Биосенсор основан на системе экспорта валина brnFE и транскрипционном регуляторе Lrp. При повышении концентрации валина внутри клетки, Lrp-регулятор активирует промотор оперона brnFE. Если под этот промотор подставить ген флуоресцентного белка, повышение уровня валина в клетке будет линейно связано с повышением уровня флуоресценции. В перспективе, использование биосенсора на основе Lrp-регулятора интересно для анализа мутаций, ведущих к усилению биосинтеза валина. Поэтому целью данной работы было конструирование данного биосенсора и анализ возможности его использования для изучения путей биосинтеза валина.

Нами была сконструирована плазмида pNS2-SV, несущая ген Lrp регулятора и ген флуоресцентного белка под промотором гена brnFE. Плазмиду pNS2-SV трансформировали в штаммы, отличающиеся по продукции валина. Данные проточной цитометрии штаммов с плазмидой pNS2-SV демонстрируют увеличение средних значений флуоресценции до 54 раз по сравнению с исходным контролем. Увеличение флуоресценции линейно коррелирует с увеличением продукции валина.



Для дальнейшего использования собранного биосенсора было решено создать штамм *Corynebacterium glutamicum* с интегрированной в хромосому конструкцией биосенсора. Для этого была сконструирована интегративная плазмида pKML-SV, при помощи которой из дикого штамма ATCC 13869 был получен штамм *Corynebacterium glutamicum* KA1. Полученный штамм KA1 интересен как инструмент для поиска новых мутаций, влияющих на биосинтез валина и для изучения путей его биосинтеза.

Литература

1. *Brinkman AB, Ettema TJ, de Vos WM, van der Oost J. The Lrp family of transcriptional regulators. Mol Microbiol. 2003 Apr;48(2):287-94.*
2. *Kennerknecht N, Sahm H, Yen MR, Pátek M, Saier Jr MH Jr, Eggeling L. Export of L-isoleucine from Corynebacterium glutamicum: a two-gene-encoded member of a new translocator family. J Bacteriol. 2002 Jul;184(14):3947-56.*
3. *Lange, C., Mustafi, N., Frunzke, J., Kennerknecht, N., Wessel, M., Bott, M., Wendisch, V.F., 2011. Lrp of Corynebacterium glutamicum controls expression of the brnFE operon encoding the export system for L-methionine and branched-chain amino acids. J. Biotechnol*
4. *Mustafi N, Grünberger A, Kohlheyer D, Bott M, Frunzke J. The development and application of a single-cell biosensor for the detection of l-methionine and branched-chain amino acids. Metab Eng. 2012 Jul;14(4):449-57.*
5. *Trötschel C, Deutenberg D, Bathe B, Burkovski A, Krämer R. Characterization of methionine export in Corynebacterium glutamicum. J Bacteriol. 2005 Jun;187(11):3786-94.*
6. *Yin L, Shi F, Hu X, Chen C, Wang X. Increasing l-isoleucine production in Corynebacterium glutamicum by overexpressing global regulator Lrp and two-component export system BrnFE. J Appl Microbiol. 2013 May;114(5):1369-77.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-318-320

USAGE OF TRANSCRIPTIONAL REGULATOR LRP BASED BIOSENSOR FOR RESEARCH OF VALINE BIOSYNTHESIS PATHWAYS IN CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM CELLS

Samarin A.A., Derbikov D.D., Yanenko A.S.

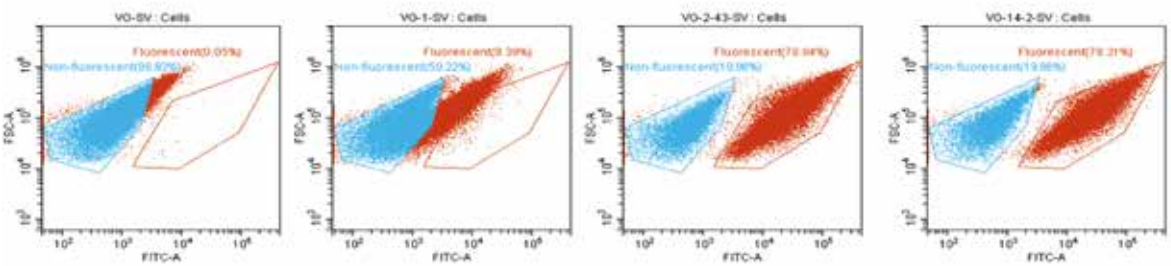
Scientific Center "Kurchatov Institute" - Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Russia, Moscow

The biosensor construction based on Lrp gene was obtained, what contains a fluorescence protein gene under control of BrnFE gene promotor. It was displayed that the fluorescence of *Corynebacterium glutamicum* cells carrying the biosensor correlates with the production of valine, and with its help it is possible to study the biosynthesis of valine.

Key words: valine; biosensor; transcriptional regulator Lrp; *Corynebacterium glutamicum*.

Construction of a new production strains of *Corynebacterium glutamicum* via random mutagenesis demands an effective analysis method for many acquiring variants. That type of method might be a valine biosensor.

The Valine biosensor is based on export system brnFE and transcriptional regulator Lrp. With increased intracellular concentration of valine Lrp-regulator activates promoter of brnFE operon. If a fluorescent protein gene is substituted for this promoter, an increase in the level of valine in the cell will be linearly related to an increase in the level of fluorescence. In perspective, usage of Lrp-regulator based biosensor interesting for mutations for valine increasing biosynthesis analysis. Therefore, purpose of this study was construction that biosensor and analysis of possibility of its use for researching the pathways of valine biosynthesis.



In this work a plasmid pNS2-SV was designed that carries Lrp gene and gene of fluorescent protein under promoter of brnFE gene. The plasmid pNS2-SV was transformed into strains, which differs by valine production. Data of flow cytometry of strains with pNS2-SV plasmid demonstrates increasing mean values of fluorescence up to 54 times compared to initial control. The increase of fluorescence linear correlates with the increase of valine production.

For further work on the designed biosensor, it was decided to construct a *Corynebacterium glutamicum* strain with integrated in chromosome biosensor construction. For this purpose, an integrative plasmid pKML-SV was made, using of which the KA1 strain of *Corynebacterium glutamicum* was obtained from the wild ATCC 13869 strain. The resulting strain KA1 is interesting as a tool for the search for new mutations affecting the biosynthesis of valine and for studying the pathways of its biosynthesis.

References

1. *Brinkman AB, Ettema TJ, de Vos WM, van der Oost J. The Lrp family of transcriptional regulators. Mol Microbiol. 2003 Apr;48(2):287-94.*
2. *Kennerknecht N, Sahm H, Yen MR, Pátek M, Saier Jr MH Jr, Eggeling L. Export of L-isoleucine from Corynebacterium glutamicum: a two-gene-encoded member of a new translocator family. J Bacteriol. 2002 Jul;184(14):3947-56.*
3. *Lange, C., Mustafi, N., Frunzke, J., Kennerknecht, N., Wessel, M., Bott, M., Wendisch, V.F., 2011. Lrp of Corynebacterium glutamicum controls expression of the brnFE operon encoding the export system for L-methionine and branched-chain amino acids. J. Biotechnol*
4. *Mustafi N, Grünberger A, Kohlheyer D, Bott M, Frunzke J. The development and application of a single-cell biosensor for the detection of l-methionine and branched-chain amino acids. Metab Eng. 2012 Jul;14(4):449-57.*
5. *Trötschel C, Deutenberg D, Bathe B, Burkovski A, Krämer R. Characterization of methionine export in Corynebacterium glutamicum. J Bacteriol. 2005 Jun;187(11):3786-94.*
6. *Yin L, Shi F, Hu X, Chen C, Wang X. Increasing l-isoleucine production in Corynebacterium glutamicum by overexpressing global regulator Lrp and two-component export system BrnFE. J Appl Microbiol. 2013 May;114(5):1369-77.*

УДК 663.12:602.4 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-320-322

ОСОБЕННОСТИ БИОКОНВЕРСИИ СОЕВОГО СЫРЬЯ В ФЕРМЕНТИРОВАННЫЕ ПРОДУКТЫ

Серба Е.М., Римарева Л.В., Таджибова П.Ю., Погоржельская Н.С., Игнатова Н.И., Оверченко М.Б.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия
111033, г. Москва, ул. Самокатная, д.4Б.
e-mail: serbae@mail.ru

Проведены сравнительные исследования биотехнологических методов получения ферментированных продуктов на основе конверсии соевого сырья подобранным комплексом эндогенных ферментов и с использованием селекционированного штамма *Aspergillus oryzae* – продуцента комплекса протеаз и других гидролаз.

Ключевые слова: соевые бобы, *Aspergillus oryzae*, ферменты, протеазы, гемицеллюлазы, α-амилаза, ферментированный соус, аминокислоты

В настоящее время широкое распространение получили ферментированные продукты, особенно, на основе соевых бобов, белок которых отличается высокой биологической ценностью. Кроме незаменимых аминокислот соевое сырье содержит другие физиологически значимые нутриенты: полиненасыщенные жирные кислоты (олеиновую, линолевую, линоленовую), полиамины, витамины (группы В, Е, пантотеновую, фолиевую кислоты, ниацин, холин, биотин), минеральные вещества и др. [1-3]. Как показали исследования, наряду с благотворным влиянием на центральную нервную и сердечно-сосудистую систему, функции печени и почек, соевые продукты оказывают антиоксидантное, противоопухолевое, гипогликемическое и гипотензивное действие [4-6]. Однако, присутствие в сое ряда антипитательных факторов побудило ученых

искать рациональные пути их снижения в соевом сырье, предназначенном для получения продуктов питания и кормов. Наиболее распространенным способом является ферментация сои, основанная на биокаталитических и биосинтетических процессах.

Результаты исследований позволили подобрать перспективный штамм *Aspergillus oryzae* RCAM 01133 - продуцент протеолитических и амилолитических ферментов и разработать алгоритм получения ферментированного соевого соуса на основе твердофазного культивирования микромицета на соевом сырье (или в смеси с другими растительными субстратами) с дальнейшей «сухой» ферментацией [7]. Установлено, что полученные ферментированные соусы содержали полный комплекс незаменимых аминокислот, растворимые углеводы в легкоусвояемой биодоступной форме и обладали хорошими органолептическими свойствами.

Другим перспективным методом получения ферментированных продуктов являлось проведение биокаталитической конверсии полимеров соевого сырья с использованием эндогенных ферментов протеолитического, амилолитического и гемицеллюлазного действия. Показано, что полученные ферментированные продукты отличались более высоким содержанием растворимых азотистых и углеводных веществ, что позволяет получать продукцию, обладающую хорошей питательной ценностью и улучшенными функциональными свойствами.

Исследования проведены за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук (тема № 0529-2019-0066).

Литература

1. *Петибская В.С. Соя: химический состав и использование: Монография. Майкоп: Изд. ОАО «Полиграф-ЮГ», 2012. – 432 с. ISBN: 978-5-7992-0733-5.*
2. *Zhang X.-M., Zhang Y.-B., Chi M-.H. Soy protein supplementation reduces clinical indices in type 2 diabetes and metabolic syndrome. Yonsei Med. J. 2016. Vol. 57. № 3. P. 681.*
3. *Serba EM, Tadzhibova PYu, Rimareva LV, Overchenko MB, Ignatova NI, Volkova GS. Bioconversion of soy under the influence of Aspergillus oryzae strains producing hydrolytic enzymes // Foods and Raw Materials. 2021. Vol. 9. № 1. P. 52–58. DOI: https://doi.org/10.21603/2308-4057-2021-1-52-58*
4. *Сидорова Ю.С., Зорин С.Н., Петров Н.А., Фролова Ю.В., Кочеткова А.А., Мазо В.К. Сравнительная оценка эффектов белка сои и его ферментолизата на липидный обмен крыс-самцов линии вистар с индуцированным ожирением // Вопросы питания. 2019 – Т. 88, № 4. – С. 18-24.*
5. *Seyma Sehadet Tasdemir, Nevin Sanlier. An insight into the anticancer effects of fermented foods: A review. November 2020 // Journal of Functional Foods. 2020. Vol. 75. № 8. P. 104281. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104281*
6. *Ke, Y. Y., Tsai, C. H., Yu, H. M., Jao, Y. C., Fang, J. M., & Wong, C. H. (2015). Latifolicinin A from a fermented soymilk product and the structure-activity relationship of synthetic analogues as inhibitors of breast cancer cell growth // Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 63. № 44. P. 9715–9721. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04028.*
7. *Serba E., Pimenov N., Mochalina P., Overchenko M., Borscheva Yu., Sharikov A., Rimareva L. Production of Aspergillus oryzae RCAM 01133 biomass with increased protein and polysaccharides content using by-products of food industry // Agronomy Research. 2020. T. 18. № 1. P. 290-300. DOI: 10.15159/ar.20.026.*

UDC 663.12:602.4 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-320-322

FEATURES OF THE BIOCONVERSION OF SOY RAW MATERIALS INTO FERMENTED PRODUCTS

Serba E.M., Rimareva L.V., Tadjibova P.Yu., Pogorzhelskaya N.S., Ignatova N.I., Overchenko M.B.

All-Russian Research Institute of Food Biotechnology - branch of the Federal State Budgetary Institution of Science of the Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russia
4B Samokatnaya str., Moscow, 111033.
e-mail: serbae@mail.ru

Comparative studies of biotechnological methods for obtaining fermented products based on the conversion of soy raw materials with a selected complex of endogenous enzymes and using a selected strain of *Aspergillus oryzae* - the producer of a complex of proteases and other hydrolases.

Keywords: soybeans, *Aspergillus oryzae*, enzymes, proteases, hemicellulases, α-amylase, fermented sauce, amino acids

Currently, fermented products are widely used, especially those based on soybeans, the protein of which is of high biological value. In addition to essential amino acids, soy raw materials contain other physiologically significant nutrients: polyunsaturated fatty acids (oleic, linoleic, linolenic), polyamines, vitamins (groups B, E, pantothenic, folic acids, niacin, choline, biotin), minerals, etc. [1-3]. Studies have shown that along with the beneficial effect on the central nervous and cardiovascular system, liver and kidney functions, soy products have an antioxidant, antitumor, hypoglycemic and hypotensive effects [4-6]. However, the presence of a number of anti-nutritional factors in soy has prompted scientists to look for rational ways to reduce them in soy raw materials intended for food and feed. The most common method is soy fermentation, based on biocatalytic and biosynthetic processes.

The results of the research allowed us to select a promising strain of *Aspergillus oryzae* RCAM 01133-a producer of proteolytic and amylolytic enzymes and to develop an algorithm for producing fermented soy sauce based on solid-phase cultivation of micromycetes on soy raw materials (or mixed with other plant substrates) with further "dry" fermentation [7]. It was found that the resulting fermented sauces contained a full complex of essential amino acids, soluble carbohydrates in an easily digestible bioavailable form and had good organoleptic properties.

Another promising method for obtaining fermented products was the biocatalytic conversion of soy raw materials polymers using endogenous enzymes of proteolytic, amylolytic and hemicellulase action. It is shown that the resulting fermented products were characterized by a higher content of soluble nitrogenous and carbohydrate substances, which makes it possible to obtain products with good nutritional value and improved functional properties.

The research was carried out at the expense of a grant for the implementation of a state task within the framework of the Program of Fundamental Scientific Research of the State Academies of Sciences (topic No. 0529-2019-0066).

References

1. *Petibskaya V. S. Soy: chemical composition and use: Monograph. – Maykop: Ed. JSC "Polygraph-YUG", 2012. – 432 p.*
2. *Zhang X.-M., Zhang Y.-B., Chi M-.H. Soy protein supplementation reduces clinical indices in type 2 diabetes and metabolic syndrome. Yonsei Med. J. 2016. Vol. 57. No.3. P. 681.*
3. *Serba EM, Tadzhibova PYu, Rimareva LV, Overchenko MB, Ignatova NI, Volkova GS. Bioconversion of soy under the influence of Aspergillus oryzae strains producing hydrolytic enzymes // Foods and Raw Materials. 2021. Vol. 9. No. 1. P. 52–58. DOI: https://doi.org/10.21603/2308-4057-2021-1-52-58*
4. *10. Sidorova Yu. S., Zorin S. N., Petrov N. A., Frolova Yu. V., Kochetkova A. A., Mazo V. K. Comparative evaluation of the effects of soy protein and its fermentolysate on the lipid metabolism of wistar male rats with induced obesity // Nutrition issues. 2019. Vol. 88, No. 4. – P. 18–24.*
5. *Seyma Sehadet Tasdemir, Nevin Sanlier. An insight into the anticancer effects of fermented foods: A review. November 2020 // Journal of Functional Foods. 2020. Vol. 75. No. 8. P. 104281. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104281*
6. *Ke, Y. Y., Tsai, C. H., Yu, H. M., Jao, Y. C., Fang, J. M., & Wong, C. H. (2015). Latifolicinin A from a fermented soymilk product and the structure-activity relationship of synthetic analogues as inhibitors of breast cancer cell growth // Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 63. No. 44. P. 9715–9721. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04028.*
7. *Serba E., Pimenov N., Mochalina P., Overchenko M., Borscheva Yu., Sharikov A., Rimareva L. Production of Aspergillus oryzae RCAM 01133 biomass with increased protein and polysaccharides content using by-products of food industry // Agronomy Research. 2020. T. 18. No. 1. P. 290-300. DOI: 10.15159/ar.20.026.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-322-324

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ АНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЛЯ КОНТРОЛЯ СОДЕРЖАНИЯ ОСНОВНЫХ НЕМЯСНЫХ ДОБАВОК В МЯСОПРОДУКТАХ

Смирнова Н.И., Зверева Е.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, e-mail: zher2dev@ya.ru

Разработаны методики для контроля содержания немясных компонентов (соединительная ткань животных, яйца, соя) в мясопродуктах, основанные на иммуноферментном анализе белков-биомаркеров – коллаген, овальбумин, соевый ингибитор трипсина.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, кинетический анализ, состав мясопродуктов, белковые биомаркеры сырья

Важным элементом характеристики поступающих в торговую сеть мясопродуктов является содержание в них немясных компонентов, соответствие их уровней заявленным рецептурам. Иммунохимические методы анализа показали свою эффективность для селективного выявления различных растительных и животных тканей, позволяя проводить простое тестирование без использования дорогостоящего оборудования. Однако при одновременном контроле в пробах нескольких компонентов крайне востребовано высокопроизводительное тестирование, для которого процессы определения всех веществ должны быть унифицированы и синхронизированы. В связи с этим задача проведенного исследования состояла в разработке иммуноферментных аналитических систем, позволяющих по единой схеме, с одинаковой пробоподготовкой и продолжительностью иммунохимических и ферментативных стадий контролировать содержание основных немясных компонентов мясопродуктов. Разработанные системы обеспечивали определение специфических биомаркеров таких компонентов – коллагена (соединительная ткань животных), овальбумина (яйца), соевого ингибитора трипсина (соя). С учетом того, что используемое сырье подвергается ферментативной и термообработке, для проведения анализа выбраны конкурентные схемы, выявляющие как нативные, так и фрагментированные белки. Наработаны поликлональные кроличьи антитела против биомаркеров. С использованием наиболее аффинных препаратов проведен скрининг условий проведения анализа – продолжительности стадий, концентрации реагентов, состав реакционной среды, с целью обеспечения полноты выявления аналитов в пробах с минимальными пределами обнаружения. Показано, что иммунохимическая стадия может быть переведена в кинетический режим и сокращена до 20 минут, а суммарная продолжительность тестирования – до 1 часа, При этом для выбранных условий обеспечивается одинаковая амплитуда сигнала при контроле всех трех биомаркеров, выявляемых в конечных экстрактах в концентрациях до 0,1-0,2 мкг/мл. Дополнительным достоинством разработанного анализа является его проведение при комнатной температуре. Проведенная апробация иммуноферментных систем показала достоверность заключений о составе тестируемых продуктов; определение концентраций контролируемых компонентов характеризовалось точностью 8-10%.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 19-16-00108).

UDC 57.083.3 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-322-324

DEVELOPMENT OF IMMUNOENZYME ANALYTICAL SYSTEMS FOR CONTROL OF THE CONTENT OF MAIN NON-MEAT COMPOUNDS IN PROCESSED MEAT PRODUCTS

Smirnova N.I., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamental Foundations of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
Leninsky prospect 33, 119071 Moscow, Russia
e-mail: zher2dev@ya.ru

Methods have been developed to control the content of non-meat components (connective tissue of animals, eggs, soy) in processed meat products, based on enzyme immunoassay of biomarker proteins – collagen, ovalbumin, soybean trypsin inhibitor.

Key words: enzyme immunoassay, kinetic assay, composition of meat products, protein biomarkers of raw materials

An important element of the characteristics of meat products entering the trading network is the content of non-meat components in them, the compliance of their levels with the declared recipes. Immunochemical methods of analysis have shown their effectiveness for selective detection of various plant and animal tissues, allowing simple testing without expensive equipment. However, with the simultaneous control of several components in samples, high-throughput testing is extremely in demand, for which the processes for determining all substances should be unified and synchronized. In this regard, the aim of the study was to develop enzyme-linked immunosorbent assay systems that allow, according to a single scheme, with the same sample preparation and duration of immunochemical and enzymatic stages, to control the content of the main non-meat components of processed meat products. The developed systems

ensured the determination of specific biomarkers of such components – collagen (connective tissue of animals), ovalbumin (eggs), soybean trypsin inhibitor (soy). Taking into account the fact that the raw materials used are subjected to enzymatic and heat treatment, competitive schemes were selected for the analysis, revealing both native and fragmented proteins. Polyclonal rabbit antibodies against the biomarkers have been obtained. With the use of the most affine preparations, the screening of the conditions of the analysis was carried out – durations of stages, concentrations of reagents, composition of the reaction medium, in order to ensure the complete detection of analytes with the minimum detection limits. It has been shown that the immunochemical stage can be transformed to kinetic regime and shortened to 20 minutes, and the total testing duration - to 1 hour. At the same time, for the chosen conditions, the same amplitude of signals is provided when controlling all three biomarkers detected in the final extracts at concentrations up to 0.1-0.2 μg/mL. An additional advantage of the proposed assay is its performance at room temperature. The approbation of the enzyme-linked immunosorbent systems has shown the reliability of conclusions about the composition of the tested products; the accuracy of determining the concentrations of the monitored components is 8-10%.

This work was financially supported by the Russian Science Foundation (grant 19-16-00108).

УДК 663.52 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-324-326

БИОКОНВЕРСИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ В СПИРТ И КОРМОПРОДУКТЫ ПО ЗАМКНУТОМУ ЦИКЛУ

Абрамова И.М., Туршатов М.В., Кривченко В.А., Соловьев А.О., Никитенко В.Д.

ВНИИПБТ – филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии». Москва, Российская Федерация.
111033, г. Москва, ул. Самокатная, д. 4Б.
lab78@mail.ru

В процессе биоконверсии зернового сырья в этиловый спирт и протеиновые кормопропродукты образуются жидкие стоки. Существует возможность применения части стоков в производственном процессе по замкнутому циклу. В статье приведены результаты исследований по применению фильтрата барды и кислого конденсата от вакуум-выпарной установки и их влиянию на метаболизм дрожжей.

Ключевые слова: безотходная переработка, этиловый спирт, жидкие стоки, кислый конденсат, фильтрат барды, утилизация.

Таблица 1 – Основные технологические показатели зрелой бражки*

Показатели	Варианты эксперимента				
	100% вода	80% вода; 20 % ФБ	50% вода; 20% ФБ**; 30% К***	20% вода; 20% ФБ**; 60% К***	20% ФБ**; 80% К***
Видимый отброд	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0
pH	4,18	4,24	4,23	4,20	4,25
Кислотность, град.	0,35	0,40	0,40	0,40	0,40
Концентрация спирта, % об.	11,25	11,28	11,24	11,17	11,18
Остаточные углеводы, г/100 см^3 **– несброженные** **– нерастворенный крахмал**	 0,25 0,11	 0,27 0,11	 0,23 0,13	 0,22 0,14	 0,27 0,13
Выход спирта, дал/т условного крахмала	66,76	66,8	66,58	66,64	66,54

-представлены усредненные данные из двух параллельных опытов; **- фильтрат барды; *- конденсат от ВВУ.*

Основной целью работы являлось проведение исследований по замене воды на стадии приготовления замеса фильтратом барды в количестве 20% и кислым конденсатом, образуемым при концентрировании фильтрата барды на вакуум-выпарной установке (ВВУ), в количестве до 80% [1,2,3]. В ходе работы оценивалось влияние их применения на основные технологические показатели брожения, выход спирта из 1 тонны условного крахмала, и образование летучих примесей.

Для проведения исследований со спиртового завода ООО «Суворовский» (Ставропольский край) были получены образцы основных и вспомогательных материалов: зерновое сырье (кукуруза); вода; фильтрат послеспиртовой барды; конденсат фильтрата барды; ферментные препараты, дрожжи.

Исследования проводились по методике постановки бродильных проб. Учитывая, что фильтрат барды и конденсат от ВВУ являются кислыми средами проводили корректировку pH замеса до значений 5,5-6,0 с целью исключения снижения активности альфа-амилазы. Варианты проведения эксперимента и основные технологические показатели брожения представлены в таблице 1. Анализ данных таблицы 1 свидетельствует о том, что во всех вариантах эксперимента произошло практически полное потребление дрожжами сбраживаемых сахаров.

При этом разница в накоплении спирта по вариантам эксперимента незначительна и находится в пределах погрешности метода. Выход спирта во всех вариантах также находится примерно на одном уровне и превышает нормативный. Результаты газохроматографического анализа показали, что состав и количество летучих примесей в дистилляте бражки практически не зависит от количества задаваемого конденсата.

Исследования проведены за счет средств субсидии на выполнение государственного задания

Литература

1. *Спиртовое производство - технологическая основа комплексной переработки зерна с получением пищевых продуктов / Кривченко В.А., Туршатов М.В., Соловьев А.О., Абрамова И.М. // Пищевая промышленность. 2019. № 4. С. 53-54.*
2. *Trend of "zero energy consumption and wastewater" in fuel ethanol production / Mao, Z., Zhang, J. // Chinese Journal of Biotechnology. Vol. 24. Iss. 6. 2008. P. 946-949.*
3. *О производстве и перспективах применения этилового спирта в России / Кононенко В.В., Туршатов М.В., Леденев В.П. и др. // Хранение и переработка сельхозсырья. 2018. № 2. С. 44-47.*

UDC 663.52 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-324-326

BIOCONVERSION OF PLANT RAW MATERIALS INTO ETHANOL AND FEED PRODUCTS IN A CLOSED CYCLE

Abramova I.M., Turshatov M.V., Krivchenko V.A., Solovyev A.O., Nikitenko V.D.

All-Russian Scientific-Research Institute of Food Biotechnology - Branch of the Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety.
Moscow, the Russian Federation. 4B, Samokatnaya str., Moscow, 111033, lab78@mail.ru

In the process of bioconversion of grain raw materials into ethyl alcohol and protein feedstuffs, liquid effluents are formed. There is a possibility of effluent using in the treatment process in a closed cycle. The article presents the results of studies on the use of stillage filtrate and acidic condensate and their effect on yeast metabolism.

Key words: waste-free processing, ethyl alcohol, liquid effluents, acidic condensate, stillage filtrate, recycling.

The main purpose of the work was to conduct research on replacing water at the stage of mash preparation on grain stillage in a quantity of 20% and acidic condensate formed by concentrating grain stillage in a vacuum evaporator in a quantity of up to 80% [1, 2, 3]. In the course of the work were evaluated the influence of these liquids on the main technological indicators of fermentation, the output of ethanol from 1 ton of starch, and the formation of volatile impurities.

Samples of basic and auxiliary materials were received from the Suvorovskiy Distillery LLC (Stavropol Region) for carrying out to investigate: grain raw materials (corn); water; distillery stillage filtrate; stillage filtrate condensate; enzyme preparations, yeast.

The research was carried out according to the method of setting fermentation samples. Taking into the fact that the distillery stillage filtrate and condensate from a vacuum evaporator is an acidic environment, the pH of the batch is adjusted to 5.5-6.0 in order to exclude a decrease in the activity of alpha-amylase. The experimental options and the main technological indicators of fermentation are presented in Table 1. Analysis of the data in table 1 indicates that in all variants of the experiment there was an almost complete consumption of fermentable sugars by the yeast.

At the same time, the difference in the accumulation of ethanol according to the variants of the experiment is insignificant and is within the error of the method.

Table 1 – The main technological indicators mature distillation wort*

Indicators	Варианты эксперимента				
	100% water	80% water; 20 % DSF	50% water; 20% DSF**; 30% CV***	20% water; 20% DSF**; 60% CV***	20% DSF**; 80% CV***
Visible fermented wort	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0
pH	4,18	4,24	4,23	4,20	4,25
Acidity	0,35	0,40	0,40	0,40	0,40
Ethanol concentration, % vol.	11,25	11,28	11,24	11,17	11,18
Residual carbohydrates g/100 cm³ **- unfermented** **- undissolved starch**	 0,25 0,11	 0,27 0,11	 0,23 0,13	 0,22 0,14	 0,27 0,13
Ethanol yield, dal / ton of conventional starch	66,76	66,8	66,58	66,64	66,54

** - averaged data are presented from two parallel experiments; ** - distillery stillage filtrate; *** - condensate from a vacuum evaporator.*

The ethanol yield in all variants is also approximately at the same level and exceeds the standard. The results of the gas chromatographic analysis showed that the composition and the number of volatile impurities in the mash are practically independent of the amount of the given condensate.

The research was carried out at the expense of a grant for the implementation of a state task.

References

1. *Ethanol production is a technological basis of grain complex processin with foodstuff producing / Krivchenko V.A., Turshatov M.V., Solovyev A.O., Abramova I.M. // Food industry. 2019. № 4. P. 53-54.*
2. *Trend of "zero energy consumption and wastewater" in fuel ethanol production / Mao, Z., Zhang, J. // Chinese Journal of Biotechnology. Vol. 24. Iss. 6. 2008. P. 946-949.*
3. *About production and usage prospects of ethyl alcohol in Russia / Kononenko V.V., Turshatov M.V., Ledenev V.P. and other // Storage and Processing of farm products. 2018. № 2. P. 44-47.*

УДК 641.563 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-326-329

ПРОДУКТ ЭНТЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ НА МЯСНОЙ ОСНОВЕ ДЛЯ НЕЙРОРЕАБИЛИТАЦИИ

Федулова Л.В., Чернуха И.М., Василевская Е.Р.

ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, Россия
109316, Москва, ул. Талалихина, д. 26, e-mail: l.fedulova@fncps.ru

В биосубстратах свиней-реконвалесцентов идентифицировано 5130 белков, 13 из которых являлись уникальными, потенциально обладающими нейротрофной активностью. Разработан прототип продукта для энтерального питания в жидкой форме на основе мяса свиней-реконвалесцентов.

Ключевые слова: инсульт; биосубстрат; свинина; энтеральное питание.

Проблема острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК) в последние годы становится все более актуальной. Инсульт занимает второе место в мире среди причин смертности. Ежегодно в мире инсульт настигает более 17 млн человек, из которых около 6 млн умирают. Инсульт молодеет в последние годы: порядка 20% нарушений кровообращения отмечаются у больных моложе 50 лет.

По прогнозам учёных, к 2030 году болезни мозга выйдут на первое место: ожидается увеличение до 23 млн новых случаев инсульта. Современные и разрабатываемые учеными терапевтические подходы включают две крупные области: нейрозащитные средства, которые чаще всего вводят в течение первых нескольких часов после инсульта и нейрореабилитационных подходов, которые начинаются от нескольких дней до месяцев после

инсульта. В ближайшем будущем для лечения острого периода инсульта будут применяться новые нейрозащитные средства (tPA, одобрен FDA в 1996 году; NA-1 - третья стадия клинических испытаний), тогда как нейрореабилитация остается одной из самых вопиющих потребностей медицины на ближайшие 10-20 лет. Сегодня менее 5% всех жертв инсульта во всем мире получают какое-либо лечение помимо базовой паллиативной помощи, а более половины выживших после перенесенного инсульта (молодых и старых) остаются с остаточными нарушениями.

Ученые изучают возможности использования таких реабилитационных методов как бионический подход к двигательной терапии, транскраниальная магнитная стимуляция для стимулирования пластичности мозга, имплантация нервных стволовых клеток для замены погибших в результате инсульта.

В комплексной терапии ОНМК все большее значение приобретают вопросы лечебного и профилактического питания, в том числе энтерального. Сегодня продукты энтерального питания представляют собой смеси нутриентов, основная функция которых - обеспечение энергетических потребностей организма с учетом специфики метаболических и функциональных нарушений, обусловленных тем или иным патологическим состоянием. Разработка таких продуктов преимущественно направлена на поиск прогрессивных технологий для получения легкоусвояемых и биобезопасных белковых композиций из молочного и растительного сырья и витаминно-минеральных смесей. При этом интересно использование при разработке энтерального питания молекулярных факторов (пептидов и аминокислот), действующих как метаболические активаторы и способствующих дието-терапии заболевания. Инновационным подходом к получению данных биоактивных факторов белковой природы является технология "tissue-engineering" для направленного воздействия на протеом. Исходя из того, что при повреждениях любого генеза в организме в процессе компенсаторных реакций активно синтезируются и депонируются молекулярные факторы белковой природы, способные инициировать процессы регенерации, направленное механическое повреждение запустит каскад реакций, за счёт которого биоактивные вещества благодаря различным системам доставки будут проникать в ткани-мишени животного и накапливаться в них. В соответствии с чем в качестве основы для энтерального питания мы использовали мясо, полученное от свиней-реконвалесцентов – восстановившихся после интрацеребральной гематомы. В биосубстратах свиней-реконвалесцентов идентифицировано 5130 белков.

Скрининг и компаративный анализ идентифицированных белков выявил 13 уникальных соединений, характерных для биосубстратов головного мозга и мышечных тканях свиней-реконвалесцентов, отсутствующих в анализируемых образцах биосубстратов ложнооперированных и интактных свиней. Так, выявлены белки-маркеры, обладающие потенциальной нейротрофной активностью: Q69G32, митохондриальный трансмембранный белок, компонент цитохрома С оксидазы (Мм 26.1 кДа), гликолитический фермент A0A287AJQ2 (Мм 28.8 кДа), пептидаза C5H0C6 (31.3 кДа), транспортный белок A0A287BD61 (Мм 32.98 кДа), домен глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) A0A287B1I8 (Мм 22.08 кДа), неохарактеризованные белки A0A287AE88 (Мм 42.01 кДа) и F1S9Q1 (Мм 72.55 кДа).

Проведено научное обоснование подходов к разработке технологии и рецептуры продукта на основе анализа основных видов, компонентов и ингредиентов продуктов для энтерального питания. В результате анализа отечественных нормативных актов, медико-биологических требований, современных публикаций составлена характеристика «идеального» продукта для энтерального питания пациентов с ОНМК. На основе спроектированной рецептуры были изготовлены экспериментальные партии прототипа продукта для энтерального питания на мясной основе в жидкой форме. Разработанная и адаптированная рецептура прототипа продукта для энтерального питания на мясной основе, включала: свинину жилованную полужирную (с массовой долей жировой ткани не более 30%), полученную от свиней-реконвалесцентов – 17.0%, сывороточный молочный белок – 2.5%, мальтодекстрин – 12.5%, инулин – 0.3%, рапсовое масло – 3.5%, палсгард – 0.4%,соевое масло – 1.0%, вода питьевая – 62.8%.

Комплексные исследования экспериментальных партий выработанного продукта показали, что регулируемые Техническим регламентом показатели качества и безопасности, промышленной стерильности, содержания токсичных элементов выработанных продуктов соответствовали требованиям, предъявляемым к консервированным мясным изделиям. Выработанный продукт для энтерального питания характеризовался гомогенностью – более 70 % частиц не превышали размер 300 мкм. 100 г выработанного продукта на мясной основе могут удовлетворить 8-12 % от суточной потребности организма мужчин и женщин в возрасте от 30 до 59 лет и свыше 60 лет в белках и жирах.

Таким образом, в результате операционного воздействия in vivo получено уникальное мясное сырье, содержащее специфичные активные компоненты и "молекулярные факторы", подобраны технологические решения для производства специализированного продукта нейропротекторного действия для энтерального питания пациентов, страдающих заболеваниями центральной нервной системы.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-76-10034).

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-326-329

MEAT-BASED ENTERAL NUTRITION FOR NEURO REHABILITATION

Fedulova L.V., Chernukha I.M., Vasilevskaya E.R.

V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems, Russian Academy of Sciences, Russian Federation 109316, Talalikhina str., 26, Moscow, e-mail: l.fedulova@fncps.ru

In the biosubstrates of reconvalescent pigs, 5130 proteins were identified, among which 13 molecules, potentially possessing neurotrophic activity, were unique. A prototype of enteral nutrition in liquid form based on the meat of reconvalescent pigs has been developed.

Key words: stroke; biosubstrate; pork; enteral nutrition.

The problem of acute cerebrovascular accident (ACVA) has become more and more urgent in recent years. Stroke is the second leading cause of death in the world. Every year in the world, a stroke overtakes more than 17 million people, of which about 6 million die. Stroke is getting younger in recent years: about 20% of circulatory disorders are observed in patients under 50 years of age. According to scientists' forecasts, by 2030 brain diseases will come out on top: an increase of up to 23 million new cases of stroke is expected.

Current and emerging therapeutic approaches include two broad areas: neuroprotective agents, which are most often administered within the first few hours after stroke, and neurorehabilitation manipulations, which begin several days to months after stroke. In the near future, new neuroprotective agents (tPA, approved by the FDA in 1996; NA-1 - the third stage of clinical trials) will be used to treat the acute period of stroke, while neurorehabilitation remains one of the most outrageous medical needs for the next 10-20 years. Today, less than 5% of all stroke victims worldwide receive any treatment other than basic palliative care, and more than half of stroke survivors (young and old) remain with residual impairment.

Scientists are exploring the possibility of using such rehabilitation methods as a bionic approach to movement therapy, transcranial magnetic stimulation to stimulate brain plasticity, and the implantation of neural stem cells to replace those killed by a stroke.

In the complex therapy of stroke, the issues of curative and preventive nutrition, including enteral nutrition, are becoming increasingly important. Today, enteral feeding formulas are a mixture of nutrients with the main function to supply of the energy needs, taking into account the specifics of metabolic and functional disorders caused by one or another pathological condition. The development of entheral feeding products is mainly aimed at finding progressive technologies for obtaining easily digestible and safety protein compositions from dairy and vegetable raw materials and vitamin-mineral mixtures. At the same time, it is interesting to use molecular factors (peptides and amino acids) in the development of enteral nutrition, which act as metabolic activators and contribute to the diet therapy of the disease. An innovative approach to obtain protein bioactive factors is tissue-engineering technology for targeted action on the proteome. Proceeding from the fact that in case of damage of any genesis in the organism during the process of compensatory reactions, protein molecular factors are actively synthesized and deposited, capable of initiating regeneration processes. Directed mechanical damage leading to start a cascade of biochemical reactions due to which bioactive substances will penetrate and accumulate into targets tissues by various delivery systems. Accordingly, as the basis for enteral nutrition formula, we used meat obtained from reconvalescent pigs - animals that recovered after an intracerebral hematoma modelling. In the biosubstrates of reconvalescent pigs, 5130 proteins were identified.

Screening and comparative analysis of the identified proteins made it possible to identify 13 unique compounds specific for brain and muscle tissues of reconvalescent pigs. This markers were absent in all analyzed samples of sham-operated and intact pigs. So, marker proteins with potential neurotrophic activity were noted: Q69G32, mitochondrial transmembrane protein, component of cytochrome C oxidase (Mm 26.1 kDa), glycolytic enzyme A0A287AJQ2 (Mm 28.8 kDa), peptidase C5H0C6 (31.3 kDa protein), transport , glial fibrillar acidic protein (GFAP) domain A0A287B1I8 (Mm 22.08 kDa), uncharacterized proteins A0A287AE88 (Mm 42.01 kDa) and F1S9Q1 (Mm 72.55 kDa).

The scientific substantiation of approaches to the development of product technology and formula based on the analysis of the main types, components and ingredients. As a result of the analysis of national regulations, medico-biological requirements, modern publications, the characteristics of the "ideal" enteral nutrition for patients with ACVA were compiled. On the basis of the designed recipe, experimental batches of a prototype liqiud product for enteral nutrition based on meat were made. The developed and adapted formulation of a prototype product for enteral nutrition on a meat basis included: trimmed pork (semi-fat, with a mass fraction of fat tissue not exceeding 30%) obtained from reconvalescent pigs - 17.0%, whey milk protein - 2.5%, maltodextrin - 12.5% , inulin - 0.3%, rapeseed oil - 3.5%, palsgard - 0.4%, soybean oil - 1.0%, drinking water - 62.8%.

Comprehensive studies of the experimental enteral nutrition showed that the indicators of quality and safety,

industrial sterility, and the content of toxic elements, regulated by the Technical Regulations, met the requirements for canned meat products.

The developed product for enteral nutrition was characterized by hight homogeneity - more than 70% of the particles did not exceed 300 μm. Also, the experimental meat-based product in the amount of 100 g can satisfy 8-12% of the daily body needs in proteins and fats of men and women aged 30 to 59 years and over 60 years.

Thus, as a result of in vivo surgical treatment, a unique meat raw material containing specific active components and "molecular factors" has been obtained, technological solutions have been selected for the production of a specialized enteral product of neuroprotective action for patients with diseases of the central nervous system.

Funding: This work was supported by the grant of the Russian Science Foundation No 19-76-10034.

УДК: 579.6 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-329-330

ТЕХНОЛОГИЯ ВЫРАЩИВАНИЯ ДРОЖЖЕЙ НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ ИЗ ЗЕЛЕНОЙ МАССЫ СИЛЬФИИ ПРОНЗЕННОЛИСТНОЙ

Б.Г. Цугкиев[1], В.Б. Цугкиева[2], А.М. Хозиев[2], Л.Б. Дзантиева[2], И.Э.Солдатова[1]

[1] Северо-Кавказский научно-исследовательский институт горного и предгорного сельского хозяйства ВНЦ РАН.
[2] Горский государственный аграрный университет, Владикавказ, 362040
E-mail: zugkiev@mail.ru. Тел. 8 (918) 826 65 34

Установлено, что зеленая масса сильфии пронзеннолистной является перспективным субстратом для выращивания дрожжей. Данное растение в условиях РСО-Алания является многолетним, высокоурожайным интродуцентом, с урожайностью до 1500 центнеров зеленой массы с гегтара. Использование зеленой массы сильфии пронзеннолистной для культивирования дрожжей экономически целесообразно, в связи с высоким содержанием питательных веществ.

Ключевые слова: дрожжи, питательные среды, сильфия пронзеннолистная, гидролиз, биомасса

В настоящее время многие ученые свои исследования посвящают поиску новых штаммов дрожжей, установлению их видовой принадлежности путем проведения идентификации и практического использования. В связи с этим, важным является поиск перспективных источников сырья, в том числе и нетрадиционных, для производства питательных сред для дрожжей. [1-4]

В эксперименте использовали зеленую массу сильфии пронзеннолистной, а также 3 штамма *Saccharomyces cerevisiae* из коллекции микроорганизмов НИИ биотехнологии ФГБОУ ВО Горский ГАУ, депонированные в (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт»-ГосНИИгенетика: *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-4280. Патент № 2665826 РФ. *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-4281. Патент № 2665788 РФ. *Sacharomyces cerevisiae* ВКПМ Y – 3415. Патент № 2445356 РФ.

Культивирование дрожжей проводили в ферментерах объемом от 1 до 100 литров. при температуре 30-32˚С и pH 4,5-5,0. К концу культивирования число КОЕ/млн/мл в варианте из высушенной зеленой массы сильфии пронзеннолистной составило 510 млн/мл, а в варианте из свежей зеленой массы данный показатель равен 620 млн/мл, т.е.на 110 млн/мл выше.

Выявлено, что биомасса дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-4280, *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-4281, *Sacharomyces cerevisiae* ВКПМ Y – 3415 характеризуется значительным содержанием в сухом веществе протеина – от 46,03% до 48,35%.

Установлено, что зеленая масса сильфии пронзеннолистной является перспективным субстратом для выращивания дрожжей.

Определено оптимальное соотношение сильфии пронзеннолистной и воды при приготовлении питательной среды для культивирования дрожжей.

Литература

1. *Губанова А.А. Возможность использования растительных материалов в производстве пекарских дрожжей /А.А.Губанова, С.И.Магеррамова, М.Г.Магеррамова, П.З.Мурадов.М.Х.Илясова //Вестник Московского государственного областного университета, серия: Естественные науки 2010.№4.-С.52-54.*

2. *Джахангирова Г.З. Исследование ферментативной активности дрожжей и особенностей роста на питательной среде из рисовой муки/ Г.З.Джахангирова, М.А.Саидходжаева, Д.Х. Махмудова, М.А.Касимова //Технические науки, 2018. - №3/48.*

3. Коннен Н.И. Пищевые и биологически активные добавки из вторичных растительных ресурсов / Н.И.Коннен, У.В.Першакова, Г.А.Шахрай, О.В.Федосеева // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского ГАУ. 2016. –Прочие сельхознауки. – С.116-119.

4. Ярашева М.Т. Совершенствование технологии получения хлебопекарных дрожжей с использованием клубней топинамбура /М.Т.Ярашева //Автореферат канд.дисс. 2011.

UDC: 579.6 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-329-330

TECHNOLOGY TO CULTURE YEASTS IN CULTURE MEDIA OF CUP PLANT GREEN MASS

© 2021 B.G. Tsugkiev[1], V.B. Tsugkieva[2], A.M. Khoziev[2], L.B. Dzantieva[2], I.E. Soldatova[1]

[1] North Caucasus Research Institute of Mountain and Foothill Agriculture, Vladikavkaz Scientific Centre of Russian Academy of Sciences.
[2] Gorsky State Agrarian University, Vladikavkaz, 362040
E-mail: zugkiev@mail.ru. Tel. 8 (918) 826 65 34

It has been found that the cup plant green mass is a promising substrate to culture yeasts. This plant in the Republic of North Ossetia-Alania is a perennial, high-yield introduced species, yielding up to 1500 cwt of green mass per hectare. Using the cup plant green mass to culture yeasts is economically preferable, due to the high nutrient content.

Keywords: yeasts, culture media, cup plant, hydrolysis, biomass

Currently, many scientists devote their research to the search for new yeast strains, determination of their species by identification and practical use. In this regard, it is important to search for promising sources of raw materials, including non-traditional ones, to produce culture media for yeasts. [1-4]

The cup plant green mass, as well as three strains of *Saccharomyces cerevisiae* from the collection of microorganisms of the Research Institute of Biotechnology of Gorsky SAU, deposited in (BRC VKPM) National Research Centre "Kurchatov Institute" - State Research Institute of Genetics were used in the experiment: *Saccharomyces cerevisiae* VKPM Y-4280. RF Patent № 2665826. *Saccharomyces cerevisiae* VKPM Y-4281. RF Patent № 2665788. *Sacharomyces cerevisiae* VKPM Y-3415. RF Patent № 2445356.

Yeasts were cultured in fermenters of 1-100 liters at a temperature of 30-32ºC and pH 4.5-5.0.

By the end of culture, the number of CFU/mln/ml in the variant of the dried cup plant green mass was 510 mln/ml, and in the variant of the fresh green mass this indicator is 620 mln/ml, i.e. 110 mln/ml higher.

It was revealed that the yeasts biomass *Saccharomyces cerevisiae* VKPM Y-4280, *Saccharomyces cerevisiae* VKPM Y-4281, *Sacharomyces cerevisiae* VKPM Y-3415 is characterized by the significant protein content in the dry matter – from 46.03% to 48.35%.

It was found that the cup plant green mass is a promising substrate to culture yeasts.

It was found the optimal ratio of cup plant and water in the culture medium preparation to culture yeasts.

References

1. Gubanova A.A. The possibility of using plant materials to obtain baker's yeasts/A.A. Gubanova, S.I. Magerramova, M.G. Magerramova, P.Z. Muradov, M.Kh. Ilyasova//Bulletin of Moscow State Regional University, series: Natural Sciences 2010. № 4. - P. 52-54.

2. Jakhangirova G.Z. Study of the enzymatic activity of yeasts and growth features in the culture medium of rice flour/G.Z. Jakhangirova, M.A. Saidkhodzhaeva, D.Kh. Makhmudova, M.A. Kasimova//Engineering sciences, 2018. - №3/48.

3. Konnen N.I. Food and biologically active additives from secondary plant resources /N.I. Konnen, U.V. Pershakova, G.A. Shakhray, O.V. Fedoseeva // Polythematic online scientific journal of Kuban state agrarian university. 2016. – Other selhoznauki. – P. 116-119.

4. Yarasheva M.T. Improving the technology to obtain baker's yeasts using Jerusalem artichoke tubers /M.T. Yarasheva // Synopsis of candidate's thesis. 2011.

УДК 577.21: 577.151.4: 637.334.2 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-331-332

РАЗРАБОТКА ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА МАРАЛА НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ KLUYVEROMYCES LACTIS

Беленькая С.В.[1,2], **Ельчанинов В.В.**[3], **Щербаков Д.Н.**[1,2]

[1] *Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия.*
[2] *ГНЦ вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора, Кольцово, Россия.*
[3] *Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Сибирский НИИ сыроделия, Барнаул, Россия.*
e-mail: dnshcherbakov@gmail.com

Разработан плазмидный вектор pSVB, позволяющий интегрировать экспрессионную кассету, содержащую ген прохимозина марала, в геном дрожжей *Kluyveromyces lactis*. Получены штаммы-продуценты обеспечивающие накопление в культуральной среде рекомбинантного химозина марала с молокосвертывающей активностью до 145 УЕ/мл.

Ключевые слова: рекомбинантный химозин марала, молокосвертывающая активность, *Kluyveromyces lactis*.

Одним из первых промышленных ферментов, полученных с помощью генно-инженерных технологий, стал рекомбинантный аналог химозина коровы, который долгое время считался эталоном коагулянта молока в сыроделии. Стремительное развитие биотехнологии и генной инженерии позволило изучать рекомбинантные химозины (рХн) различной видовой принадлежности. В частности, было установлено, что рХн одногорбого верблюда и альпака превосходят рХн коровы по удельной молокосвертывающей активности (МА) и специфичности, но уступают коровьему ферменту по термостабильности [1, 2]. Эти данные позволяют предполагать, что в природе существуют химозины с еще более высокими технологическими характеристиками. Поиск таких ферментов является актуальной биотехнологической задачей.

Целью данной работы была разработка продуцента рХн марала на основе дрожжей *Kluyveromyces lactis*.

Дрожжи *Kluyveromyces lactis* имеют долгую историю безопасного использования в пищевой промышленности, их геном секвенирован, они легко культивируются и поддается генетическим манипуляциям, демонстрируют отрицательный эффект Крэбтри и обеспечивают приемлемый посттрансляционный процессинг синтезируемых белков [2].

Для получения продуцента рХн марала на основе *K. lactis* был спроектирован вектор, содержащий генетические элементы, обеспечивающие эффективный синтез и секрецию целевых белков. Центральным элементом вектора является гибридный промотор, состоящий из коровой последовательности промотора глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы и регуляторной последовательности промотора изоцитрат лиазы. В экспрессионную кассету также были включены: сигнальная последовательность α-MF *S. cerevisiae*, обеспечивающая секрецию целевого белка во внеклеточное пространство, терминаторная область гена CYC1 *S. cerevisiae*, промотор гена алкогольдегидрогеназы, ген ацетамидазы, как селективный маркер для отбора трансформантов. В составе сконструированного вектора была клонирована последовательность прохимозина (ПроХн) марала, в результате чего был получен вектор pSVB-Cer. Для получения штамма-продуцента, линеаризированным плазмидным вектором pSVB-Cer, проводили электропорацию культуры *K. lactis* штамм GG799. Отбор рекомбинантных клонов вели на среде, содержащей в качестве источника азота ацетамид. Отобранные клоны культивировали в среде YEP, содержащей 2% глюкозы. По завершении культивирования рекомбинантный ПроХн активировали непосредственно в культуральной жидкости и определяли её коагуляционную активность по отношению к молоку коровы. В результате, получены штаммы, обеспечивающие накопление в культуральной среде рХн марала с молокосвертывающей активностью 100-145 УЕ/мл.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (номер темы FZMW-2020-0002, "Разработка продуцентов рекомбинантных ферментов для сыроделия").

Литература

1. *Kappeler S. R., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhan Z., Hansen E. B., Johansen E. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk // Biochem. Biophys. Res. Comm. - 2006.- V. 2.- № 342.- P. 647–654.*
2. *Belenkaya S.V., Rudometov A.P., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Kriger A.V., Belov A.N., Koval A.D., Elchaninov V.V. Biochemical Properties of Recombinant Chymosin in Alpaca (Vicugna pacos L.) // Appl. Biochem. Microbiol.- 2018.- V. 54.- № 6.- P. 569–576.*
3. *Spohner S.C., Schaum V., Quitmann H., Czermak P. Kluyveromyces lactis: an emerging tool in biotechnology // J. Biotechnol.- 2016.- V. 222.- P. 104-116.*

УДК 577.21: 577.151.4: 637.334.2 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-331-332

DEVELOPMENT OF A PRODUCER OF RECOMBINANT MARAL CHYMOSIN BASED ON THE YEAST KLUYVEROMYCES LACTIS

Belenkaya S.V.[1,2], **Elchaninov V.V.**[3], **Shcherbakov D.N.**[1,2]

[1] *Altai State University, Barnaul, Russia.*
[2] *State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" Rospotrebnadzora, Koltsovo, Russia.*
[3] *Federal Altay Scientific Centre of Agrobiotechnologies, Siberian Institute of Cheese Making, Barnaul, Russia.*
e-mail: dnshcherbakov@gmail.com

A plasmid vector pSVB was developed, which allows integrating an expression cassette containing the maral prochymosin gene into the genome of the yeast *Kluyveromyces lactis*. Producer strains have been obtained that ensure the accumulation of recombinant maral chymosin in the culture medium with a milk-clotting activity of up to 145 AU / ml.

Key words: recombinant maral chymosin, milk-clotting activity, *Kluyveromyces lactis*.

One of the first industrial enzymes obtained using genetic engineering technologies was the recombinant analogue of cow chymosin, which has long been considered the standard of milk coagulant in cheese making. The rapid development of biotechnology and genetic engineering has made it possible to study recombinant chymosins (rChn) of various species. In particular, it was found that the rChn of camel and alpaca are superior to that of a cow in terms of specific milk-clotting activity (MA) and specificity, but inferior to that of a bovine enzyme in terms of thermal stability [1, 2]. These data suggest that chymosins with even higher technological characteristics exist in nature. The search for such enzymes is an urgent biotechnological task.

The aim of this work was to develop a producer of rChn maral based on the yeast Kluyveromyces lactis.

The yeast Kluyveromyces lactis has a long history of safe use in the food industry, its genome is sequenced, it is easy to cultivate and amenable to genetic manipulation, exhibits a negative Crabtree effect, and provides acceptable post-translational processing of synthesized proteins [2].

To obtain a producer of rChn maral on the basis of K. lactis, a vector was designed containing genetic elements that ensure efficient synthesis and secretion of target proteins. The central element of the vector is a hybrid promoter consisting of the core sequence of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter and the regulatory sequence of the isocitrate lyase promoter. The expression cassette also included: the S. cerevisiae α-MF signal sequence, which ensures the secretion of the target protein into the extracellular space, the terminator region of the S. cerevisiae CYC1 gene, the promoter of the alcohol dehydrogenase gene, and the acetamidase gene as a selective marker for the selection of transformants. As part of the constructed vector, the prochymosin (ProChn) sequence of maral was cloned, as a result of which the vector pSVB-Cer was obtained. To obtain a producer strain linearized with the plasmid vector pSVB-Cer, the culture of K. lactis strain GG799 was electroporated. The selection of recombinant clones was carried out on a medium containing acetamide as a nitrogen source. Selected clones were cultured in YEP medium containing 2% glucose. Upon completion of cultivation, the recombinant ProChn was activated directly in the culture liquid and its coagulation activity in relation to cow's milk was determined. As a result, strains have been obtained that ensure the accumulation of rChn of maral in the culture medium with a milk-clotting activity of 100-145 AU / ml.

The work was performed within the framework of the state task of the Ministry of science and higher education of the Russian Federation (topic number FZMW-2020-0002, "Development of recombinant enzyme producers for cheese making").

References

1. *Kappeler S. R., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhan Z., Hansen E. B., Johansen E. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk // Biochem. Biophys. Res. Comm. - 2006.- V. 2.- № 342.- P. 647–654.*
2. *Belenkaya S.V., Rudometov A.P., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Kriger A.V., Belov A.N., Koval A.D., Elchaninov V.V. Biochemical Properties of Recombinant Chymosin in Alpaca (Vicugna pacos L.) // Appl. Biochem. Microbiol.- 2018.- V. 54.- № 6.- P. 569–576.*
3. *Spohner S.C., Schaum V., Quitmann H., Czermak P. Kluyveromyces lactis: an emerging tool in biotechnology // J. Biotechnol.- 2016.- V. 222.- P. 104-116.*

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ: ОТ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ НАУКИ ДО ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

GENE ENGINEERING IN LIVESTOCK: FROM FUNDAMENTAL STUDIES TO PRACTICAL APPLICATION

1. ИССЛЕДОВАНИЕ ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНОМНОЙ СТРУКТУРЫ И ХАРАКТЕРА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИВЕРГЕНЦИИ ПОРОД ЛОШАДЕЙ (EQUUS CABALLUS L.)
Зайцев А. М. Калашников В. В., Храброва Л. А., Блохина Н.В. Калашникова Т. В. 335

A STUDY OF THE POPULATION GENOMIC STRUCTURE AND THE CHARACTER OF THE GENETIC DIVERGENCE OF EQUINE BREEDS (EQUUS CABALLUS L.)
Zaitsev A.M., Kalashnikov V.V., Khrabrova L.A., Blokhina N.V. Kalashnikova T.V. 337

2. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОМНОЙ АРХИТЕКТУРЫ СОВРЕМЕННЫХ И ИСТОРИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ДВУХ РОССИЙСКИХ ПОРОД КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
Зиновьева Н.А., Абдельманова А.С., Доцев А.В., Харзинова В.Р., Боронецкая О.И., Сермягин А.А., Чинаров Р.Ю., Мишина А.И. 338

COMPARATIVE STUDY OF THE GENOMIC ARCHITECTURE OF MODERN AND HISTORICAL SAMPLES OF TWO RUSSIAN CATTLE BREEDS
Zinovieva N.A., Abdelmanova A.S., Dotsev A.V., Kharzinova V.R., Boronetskaya O.I., Sermyagin A.A., Chinarov R.Yu., Mishina A.I. 339

3. ЖИВОТНОВОДСТВО ЮГА РОССИИ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ НА ОСНОВЕ ВНЕДРЕНИЯ СОВРЕМЕННЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
Горлов И.Ф., Анисимова Е.Ю., Мосолова Н.И., Данилов Ю.Д., Карпенко Е.В., Княжеченко О.А. 340

ANIMAL HUSBANDRY IN THE SOUTH OF RUSSIA: THE STATE AND PROSPECTS OF DEVELOPMENT BASED ON THE INTRODUCTION OF MODERN MOLECULAR GENETIC TECHNOLOGIES
Gorlov I. F., Anisimova E. Yu., Mosolova N. I., Danilov Yu. D., Karpenko E. V., Knyazhechenko O. A. 342

4. РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ К ПРИЖИЗНЕННОЙ ОЦЕНКЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПУТЕМ 3D-ВИЗУАЛИЗАЦИИ ХОЗЯЙСТВЕННО-БИОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ЖИВОТНЫХ.
Колпаков В.И., Ручай А.Н. 344

DEVELOPMENT OF NEW APPROACHES TO THE LIFETIME ASSESSMENT OF CATTLE BY 3D VISUALIZATION OF THE ECONOMIC, BIOLOGICAL AND GENETIC CHARACTERISTICS OF ANIMALS.
Kolpakov V.I., Ruchay A.N. 345

5. КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ РОССИЙСКИХ ПОРОД КРС И ОВЕЦ
ДЛЯ ПОИСКА НУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ АДАПТАЦИИ
И ЭКОНОМИЧЕСКИ-ВАЖНЫХ ФЕНОТИПОВ НА ГЕННОМ УРОВНЕ
Ларкин Д.М. 345

COMPREHENSIVE ANALYSIS OF THE GENOMES OF RUSSIAN CATTLE AND SHEEP BREEDS
TO FIND NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS TO IMPROVE ADAPTATION
AND ECONOMICALLY IMPORTANT PHENOTYPES AT THE GENE LEVEL
Larkin D.M. 346

6. РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ МОНИТОРИНГА И СОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ
НА ПРИМЕРЕ АБОРИГЕННЫХ КОЗ АЛТАЙСКИХ ГОР МОНГОЛИИ
Пискунов А. К.., Воронкова В.Н., Бекетов С.В., Столповский Ю. А. 347

DEVELOPMENT OF A SYSTEM FOR MONITORING AND PRESERVATION OF GENETIC RESOURCES
ON THE EXAMPLE OF ABORIGENOUS GOATS OF THE ALTAI MOUNTAINS OF MONGOLIA
Piskunov A.K .., Voronkova V.N., Beketov S.V., Stolpovsky Yu. A. 348

7. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПО STR-МАРКЕРАМ И ПОКАЗАТЕЛИ
ПРОДУКТИВНОСТИ КАРАЧАЕВСКИХ КОЗ В РАЗНЫХ ЗОНАХ РАЗВЕДЕНИЯ
Селионова М.И., Айбазов А.М.М., Мамонтова Т.В., Харзинова В.Р., Зиновьева Н.А. 349

GENETIC DIFFERENTIATION BY STR-MARKERS AND PRODUCTIVITY TRAITS
OF KARACHAEV GOATS FROM DIFFERENT BREEDING ZONES
Selionova M.I., Aibazov A.M.M, Mamontova T.V., Kharzinova V.R., Zinovieva N.A. 351

8. ПОИСК ПОЛНОГЕНОМНЫХ АССОЦИАЦИЙ ДЛЯ СОДЕРЖАНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ
В МОЛОКЕ КОРОВ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ ИНФРАКРАСНЫХ СПЕКТРОВ
Сермягин А.А., Гладырь Е.А., Игнатьева Л.П., Лашнева И.А.,
Косицин А.А., Артемьева О.А., Ермилов А.Н., Зиновьева Н.А. 352

GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY FOR COWS' MILK FATTY ACIDS DERIVED BY INFRARED SPECTRA
Sermyagin A.A., Gladyr E.A., Ignatieva L.P., Lashneva I.A.,
Kositsin A.A., Artemieva O.A., Ermilov A.N., Zinovieva N.A. 353

9. МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ И КАЧЕСТВЕННЫЕ
ПОКАЗАТЕЛИ МОЛОКА КАРАЧАЕВСКИХ И НУБИЙСКИХ КОЗ
Трухачев В.И., Селионова М.И., Айбазов А.М.М., Боголюбова Н.В., Зиновьева Н.А. 354

METABOLIC PROFILE AND QUALITATIVE TRAITS OF MILK OF KARACHAEV AND NUBIAN GOATS
Trukhachev V.I., Selionova M.I., Aibazov A.M.M, Bogolyubova N. V., Zinovieva N.A. 356

10.ОСОБЕННОСТИ АДИПОГЕНЕЗА БЕЛОЙ, БЕЖЕВОЙ И БУРОЙ ЖИРОВЫХ ТКАНЕЙ
Чернуха И.М., Котенкова Е.А. 358

ADIPOGENESIS FEATURES OF WHITE, BEIGE AND BROWN ADIPOSE TISSUES
I.Chernukha, E. Kotenkova 359

УДК 636.1.082:575 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-335-338

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНОМНОЙ СТРУКТУРЫ И ХАРАКТЕРА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИВЕРГЕНЦИИ ПОРОД ЛОШАДЕЙ (EQUUS CABALLUS L.)

Зайцев А.М. Калашников В.В., Храброва Л.А., Блохина Н.В. Калашникова Т.В.

Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства» (ФГБНУ «ВНИИ коневодства»)
391105, п/о Институт коневодства, Рыбновский район, Рязанская область

Впервые проведено полногеномное исследование для 6 отечественных аборигенных пород (кабардинская, вятская, забайкальская, якутская, обладающих уникальными приспособительными качествами и 2 заводских пород, жестко селекционируемых по разнонаправленным признакам. Получены данные о состоянии генетической структуры пород. Изучены филогенетические отношения между породами, определены предковые группы, участвовавшие в формировании породной структуры, оценено влияние заводских пород-улучшателей на микроэволюцию местных пород. Результаты исследований соотнесены с имеющимися в свободном доступе результатами полногеномного анализа зарубежных популяций и пород лошадей. Намечены пути выявления комплексов, характеризующих выраженность селекционируемых признаков у пород с разными направлениями использования. Определена высокая эффективность использования полученных результатов для определения принадлежности к конкретной породе. Создана база данных гаплотипов митохондриальной ДНК и Y-хромосомы для проведения ретроспективного анализа происхождения и уточнения племенных записей в системе централизованного племенного учета в коневодстве. В качестве дополнительных маркеров использованы таргетные SNP, характеризующие выраженность селекционируемых признаков.

Ключевые слова: генетические ресурсы, Equus caballus, молекулярно-генетические маркеры, полногеномный анализ, маркеры Y-хромосомы, генетическая реконструкция, маркирование селекционируемых признаков

Впервые проведено полногеномное исследование структуры и филогенетических отношений аборигенных пород лошадей России.

Создан банк ДНК лошадей восьми пород (n = 192), включая вятскую, кабардинскую, тувинскую, забайкальскую, якутскую, ахалтекинскую, орловскую и арабскую. Концентрации двухцепочечной ДНК в образцах варьировали от 6 до 90 нг/мкл (OD260/OD280 = 1,51 - 2,14).

Проведенное полногеномное генотипирование образцов с использованием ДНК-чипа Equine 50K BeadChip показало эффективность от 0,88 до 0,99, при этом 191 из 192 исследованных образцов были генотипированы с эффективностью выше 0,90.

По результатам контроля качества генотипирования для анализа было отобрано 37691 SNP и 184 головы лошадей. Выполнена оценка уровня генетического разнообразия изучаемых пород лошадей. Установлено, что минимальным уровнем генетического разнообразия среди локальных пород характеризовалась якутская порода, среди заводских – арабская. Анализ генетической структуры популяций показал участие в формировании исследованных пород лошадей шести предковых популяций, соответствующих трем заводским породам - ахалтекинской, орловской рысистой, арабской и трем локальным породам – вятской, якутской и части животных забайкальской породы. Кабардинская и тувинская породы проявляют смешанное происхождение с участием в их формировании нескольких предковых популяций.

Среди исследованных пород лошадей минимальным уровнем генетического разнообразия характеризовалась якутская порода, максимальным – кабардинская. При проведении филогенетических исследований, основанных на полногеномном анализе обнаружено, наиболее генетически удаленной от исследованных пород лошадей является арабская порода. Это вполне соответствует классическим представлениям о филогенезе конских пород, характере разведения (исключительно чистопородное на протяжении как минимум трех столетий) и незначительном влиянии (улучшении), оказанном на другие представленные в выборке породы. Кабардинская порода занимает центральное положение, что позволяет предположить участие в ее создании других исследованных нами пород (в частности, арабской и ахалтекинской). Якутская порода формирует четкий консолидированный кластер, который частично перекрывается с тувинской породой,

что позволяет предположить наличие у них общих предков. Это частично подтверждает и гипотезу о появлении якутской породы в результате скрещивания ныне вымершей формы северной лошади с лошадьми монгольского корня. Вятская порода четко дифференцируется от других исследованных локальных пород, что указывает на ее более раннее расхождение от группы, объединяющей тувинскую, забайкальскую и якутскую породы.

Анализ значений генетических дистанций Fst подтверждает наибольшую генетическую удаленность арабской породы лошадей от других исследованных пород. Существенно меньшие генетические дистанции между арабской и кабардинской породами по сравнению с генетическими дистанциями между арабской и другими российскими породами указывает на вероятное участие арабской породы в формировании аллелофонда кабардинской породы. Формирование арабской и ахалтекинской породами общей ветви на Neighbor-Net указывает на наличие у них общих предков.

Новизна проведенных исследований заключается в том, что впервые получены данные о генетическом разнообразии пород лошадей, разводимых в России, на полногеномном уровне. Таким образом, впервые получены сведения, формирующие знания о филогенезе отечественных пород лошадей.

Дифференциация пород по направлению использования позволила определить основные таргетные комплексы для дальнейшего исследования локусов, находящихся под давлением отбора.

Получены предварительные результаты, позволяющие эффективно использовать расчет генетических дистанций, полученных при анализе массивов SNP-данных для определения породности.

В результате проведенных исследований оптимизирована методика выделения ДНК из волосяных луковиц, позволяющая получать ДНК, по своим количественным и качественным характеристикам пригодную для проведения полногеномного SNP генотипирования.

Существенно дополнена база результатов анализа маркеров, характеризующих гаплотипы митохондриальной ДНК (82 образца) и Y-хромосомы (102 образца), позволяющая оценивать как филогенез, так и использовать методы ретроспективного анализа происхождения, уточнять племенные записи. Проведена модернизация базы данных генетического тестирования ФГБНУ "ВНИИ коневодства", подготовлены две заявки на РИД. Обнаружено 2 новых гаплотипа митохондриальной ДНК у лошадей вятской породы, с высокой степенью вероятности относящихся к ранее не описанным гаплогруппам.

В отношении изучения таргетных SNP проведен анализ полиморфизма генов DMRT3 и миостатина у местных пород лошадей. Получены результаты для использования маркеров в качестве определяющих генетическое влияние пород-улучшателей. Впервые получены результаты для приобской и печорской лошадей России, полесской лошади Белоруссии, ряда уникальных, ранее не исследованных популяций якутской породы лошадей.

Проведены работы по восстановлению происхождения и предварительной оценке выбранных для исследования в последующем выборок отечественных аборигенных пород и популяций лошадей.

Ипользование результатов исследований будет применено в работе по ведению племенного учета в коневодстве.

Литература

1. *Храброва Л.А. Стратегия использования генетических маркеров и геномной селекции в коневодстве. - Дивово, 2015. - 81 с*
2. *Храброва Л.А., Алексеева Е.И. Прогресс ДНК-технологий в коневодстве. Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. 2015. № 39. С. 149-154.*
3. *Almarzook, S. Genetic diversity of Syrian Arabian horses / S. Almarzook, M. Reissmann, D. Arends, G. A. Brockmann // Animal Genetics. – 2017. – Vol. 48(4). DOI:10.1111/age.12568*
4. *Amano, T. et al. Genome-wide association mapping and examination of possible maternal effect for the pace trait of horses // Animal Genetics. – 2018. https://doi.org/10.1111/age.12711*
5. *Andersson L.S. , Larhammar L.S., F. Memic F. et al. Mutations in DMRT3 affect locomotion in horses and circuit function in mice // Nature. 2012. - N 488. - P. 642- 646*
6. *Bierman, A. Lavender foal syndrome in Arabian horses is caused by a single-base deletion in the MYO5A gene / Bierman, A., Guthrie, A.J., Harper, C.K. // Animal Genetics. – 2010. – Vol. 41 (Suppl.2). – P. 199-201.*
7. *Bowling, A.T. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing / Bowling, A.T., Eggleston-Stott, M.L., Byrns,G., Clark, R.S., Dileanis, S., Wictum, E. // Animal Genetics. – 1997. – Vol. 28. – P. 247-252*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-335-338

A STUDY OF THE POPULATION GENOMIC STRUCTURE AND THE CHARACTER OF THE GENETIC DIVERGENCE OF EQUINE BREEDS (EQUUS CABALLUS L.)

Zaitsev A.M., Kalashnikov V.V., Khrabrova L.A., Blokhina N.V. Kalashnikova T.V.

For the first time, a genome-wide study was conducted for 6 native breeds (Kabardian, Vyatka, zabaikalian, Yakut) with unique adaptive qualities and 2 cultural breeds that are strictly selected for multidirectional characteristics. Data on the state of the genetic structure of breeds were obtained. The phylogenetic relationships between breeds were studied, the ancestral groups that participated in the formation of the breed structure were determined, and the influence of factory improver breeds on the microevolution of local breeds was estimated. the results of the research are correlated with the freely available results of the genome-wide analysis of foreign horse populations and breeds. The ways of identifying complexes that characterize the severity of selected traits in breeds with different directions of use are outlined. The high efficiency of using the obtained results to determine belonging to a particular breed is determined. A database of mitochondrial DNA and Y-chromosome haplotypes was created to conduct a retrospective analysis of the origin and refinement of breeding records in the system of centralized breeding records in horse breeding. As additional markers, we used targeted SNPs that characterize the severity of selected traits

Keywords: genetic resources, Equus caballus, molecular genetic markers, full genome analysis, Y chromosome markers, genetic reconstruction, marking of selectable traits

For the first time, a full-genomic study of the structure and phylogenetic relationships of native horse breeds in Russia was conducted.

A DNA bank of horses of eight breeds (n = 192) was created, including Vyatskaya, Kabardian, Tuvinskaya, Trans-Baikal, Yakut, Akhal-Teke, Orlov trotter and Arabian. The concentrations of double-stranded DNA in the samples ranged from 6 to 90 ng / ml (OD260/OD280 = 1.51-2.14).

The full-genome genotyping of samples using the Equine 50K BeadChip DNA chip showed an efficiency of 0.88 to 0.99, while 191 of the 192 samples studied were genotyped with an efficiency higher than 0.90.

According to the results of the genotyping quality control, 37691 SNPs and 184 horse heads were selected for analysis. The level of genetic diversity of the studied horse breeds was assessed. It was found that the Yakut breed was characterized by the minimum level of genetic diversity among local breeds, and the Arabian breed among factory breeds. The analysis of the genetic structure of the populations showed the participation in the formation of the studied horse breeds of six ancestral populations corresponding to three factory breeds-Akhal-Teke, Orlov trotter trotting, Arabian and three local breeds – Vyatskaya, Yakut and part of the animals of the Trans-Baikal breed. The Kabardian and Tuvinskayan breeds show a mixed origin with the participation of several ancestral populations in their formation.

Among the studied horse breeds, the Yakut breed was characterized by the minimum level of genetic diversity, the Kabardian breed was characterized by the maximum.

When conducting phylogenetic studies based on genome-wide analysis, it was found that the most genetically distant from the studied horse breeds is the Arabian breed. This is quite consistent with the classical ideas about the phylogeny of horse breeds, the nature of breeding (exclusively purebred for at least three centuries) and the insignificant influence (improvement) exerted on other breeds represented in the sample. The Kabardian breed occupies a central position, which suggests the participation in its creation of other breeds studied by us (in particular, the Arabian and Akhal-Teke). The Yakut breed forms a clear consolidated cluster, which partially overlaps with the Tuvinskayan breed, which suggests that they have common ancestors. This partially confirms the hypothesis about the appearance of the Yakut breed as a result of crossing the now extinct form of the northern horse with horses of the Mongolian root. The Vyatskaya breed is clearly differentiated from other studied local breeds, which indicates its earlier divergence from the group that unites the Tuvinskayan, Trans-Baikal and Yakut breeds.

The analysis of the values of the Fst genetic distances confirms the greatest genetic distance of the Arabian horse breed from other studied breeds. The significantly smaller genetic distances between the Arabian and Kabardian breeds compared to the genetic distances between the Arabian and other Russian breeds indicates the likely participation of the Arabian breed in the formation of the Kabardian breed allelofund. The formation of the Arabian and Akhal-Teke breeds of a common branch on the Neighbor-Net indicates the presence of common ancestors.

The novelty of the conducted research lies in the fact that for the first time data on the genetic diversity of horse breeds bred in Russia were obtained at the full-genome level. Thus, for the first time, information was obtained that forms knowledge about the phylogeny of domestic horse breeds.

The differentiation of the rocks by the direction of use allowed us to determine the main target complexes for further research of loci under selection pressure.

Preliminary results have been obtained that allow us to effectively use the calculation of genetic distances obtained by analyzing SNP data arrays to determine pedigree.

As a result of the conducted studies, the method of DNA isolation from hair follicles has been optimized, which allows obtaining DNA, according to its quantitative and qualitative characteristics, suitable for carrying out full-genome SNP genotyping.

The database of the results of the analysis of markers characterizing the haplotypes of mitochondrial DNA (82 samples) and Y-chromosome (102 samples) has been significantly supplemented, which makes it possible to evaluate both phylogeny and use methods of retrospective analysis of origin, to refine breeding records. The database of genetic testing of the FGBNU "Research Institute of Horse Breeding" has been modernized, two applications for RID have been prepared. 2 new mitochondrial DNA haplotypes were found in horses of the Vyatskaya breed, with a high degree of probability belonging to previously undescribed haplogroups.

In relation to the study of targeted SNPs, the polymorphism of the DMRT3 and myostatin genes in local horse breeds was analyzed. The results were obtained for the use of markers as determining the genetic influence of improver breeds. For the first time, the results were obtained for the Priobskaya and Pechora horses of Russia, the Polesskaya horse of Belarus, a number of unique, previously unexplored populations of the Yakut horse breed.

Work has been carried out to restore the origin and preliminary assessment of the samples of domestic aboriginal breeds and horse populations selected for the study in the future.

The use of the research results will be applied in the work on maintaining breeding records in horse breeding

References

1. *Khrabrova L. A. Strategy of using genetic markers and genomic selection in horse breeding. - Divovo, 2015. - 81 p*
2. *Khrabrova L. A., Alekseeva E. I. Progress of DNA technologies in horse breeding. Proceedings of the St. Petersburg State Agrarian University. 2015. No. 39. pp. 149-154.3.*
3 *Almarzook, S. Genetic diversity of Syrian Arabian horses / S. Almarzook, M. Reissmann, D. Arends, G. A. Brockmann // Animal Genetics. – 2017. – Vol. 48(4). DOI:10.1111/age.12568*
4. *Amano, T. et al. Genome-wide association mapping and examination of possible maternal effect for the pace trait of horses // Animal Genetics. – 2018. https://doi.org/10.1111/age.12711*
5. *Andersson L.S. , Larhammar L.S., F. Memic F. et al. Mutations in DMRT3 affect locomotion in horses and circuit function in mice // Nature. 2012. - N 488. - P. 642- 646*
6. *Bierman, A. Lavender foal syndrome in Arabian horses is caused by a single-base deletion in the MYO5A gene / Bierman, A., Guthrie, A.J., Harper, C.K. // Animal Genetics. – 2010. – Vol. 41 (Suppl.2). – P. 199-201.*
7. *Bowling, A.T. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing / Bowling, A.T., Eggleston-Stott, M.L., Byrns,G., Clark, R.S., Dileanis, S., Wictum, E. // Animal Genetics. – 1997. – Vol. 28. – P. 247-252*

УДК 638.123:575.2 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-338-340

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОМНОЙ АРХИТЕКТУРЫ СОВРЕМЕННЫХ И ИСТОРИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ДВУХ РОССИЙСКИХ ПОРОД КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Зиновьева Н.А.[1], **Абдельманова А.С.**[1], **Доцев А.В.**[1], **Харзинова В.Р.**[1], **Боронецкая О.И.**[2], **Сермягин А.А.**[1], **Чинаров Р.Ю.**[1], **Мишина А.И.**[1]

[1] *ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Московская обл., Россия*
142132, Московская обл. г.о. Подольск, п. Дубровицы, д. 60
[2] *ФГБОУ ВО РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева, г. Москва, Россия*
127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49
e-mail: n_zinovieva@mail.ru

На основании анализа полногеномных SNP-генотипов выполнено исследование генетического разнообразия и генетической структуры современных и исторических образцов крупного рогатого скота холмогорской и ярославской пород. Показано сохранение у современных представителей пород исторических геномных компонентов.

Ключевые слова: ярославская порода, холмогорская порода, биоразнообразие, полногеномное SNP-генотипирование.

Локальные породы скота являются носителями уникальных форм изменчивости, вносящих весомый вклад в глобальное генетическое разнообразие генетических ресурсов животных. Идентификация на геномном уровне исходных аллелей и уникальных аллельных сочетаний, носителями которых являются такие породы, имеет особую актуальность для разработки научно-обоснованных программ их разведения, направленных на повышение продуктивных качеств при сохранении исходных специфических аллелей и гаплотипов, свойственных локальным породам. Вместе с тем, исследование современных популяций российских пород скота даже с использованием такого мощного инструмента как полногеномный SNP-анализ не всегда позволяет однозначно интерпретировать полученные результаты с точки зрения демографической истории пород. Информационная значимость результатов исследований, полученных с использованием молекулярно-генетических методов, может быть существенно повышена за счет изучения исторических образцов ДНК животных, существовавших до начала интенсивной селекции (до середины XX века). Источником ДНК для проведения такого рода исследований могут стать образцы костной ткани черепов, сохраняемых в краниологических коллекциях.

Нами выполнено сравнительное исследование аллелофонда двух российских пород крупного рогатого скота – холмогорской и ярославской на основании анализа полногеномных SNP-генотипов современных (n=16, n=31, соответственно) и музейных образцов (n=12, n=6, соответственно), датированных первой половиной прошлого века. Для сравнения в исследования были включены выборка современных представителей голштинской породы (n=15) и исторический образец северного великоросского скота (n=1).

Уровень аллельного разнообразия (Ar) у исторического холмогорского скота был достоверно ниже, а ярославского скота – достоверно выше по сравнению с современными популяциями аналогичных пород (Ar=1.873±0.001 против 1.896±0.001, p<0,001; Ar=1.879±0.002 против 1.846±0.002, p<0,001, соответственно). В обоих исторических популяциях скота был отмечен достоверный дефицит гетерозигот. Расчет генетических дистанций показал наибольшую близость исторического ярославского скота с великоросским скотом (Fst=0,079). Современный холмогорский скот имел существенно большее генетическое сходство с историческим холмогорским скотом (Fst=0,026) по сравнению со значением данного параметра для исторического и современного ярославского скота (Fst=0,078). Это позволяет предположить действие других факторов отбора на современную популяцию ярославского скота. Результаты анализа генетической структуры показали сохранение в современных популяциях обеих изучаемых пород исторических геномных компонентов. Полученные нами данные могут быть использованы для разработки программ сохранения ярославской и холмогорской пород крупного рогатого скота. Исследования выполнены при поддержке Российского научного фонда, проект № 19-76-20012.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-338-340

COMPARATIVE STUDY OF THE GENOMIC ARCHITECTURE OF MODERN AND HISTORICAL SAMPLES OF TWO RUSSIAN CATTLE BREEDS

Zinovieva N.A.[1], **Abdelmanova A.S.**[1], **Dotsev A.V.**[1], **Kharzinova V.R.**[1], **Boronetskaya O.I.**[2], **Sermyagin A.A.**[1], **Chinarov R.Yu.**[1], **Mishina A.I.**[1]

[1] *L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Moscow region, Russia*
142132, Moscow region, Podolsk, Dubrovitzy village, 60
[2] *Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia*
127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49
e-mail: n_zinovieva@mail.ru

Based on the analysis of genome-wide SNP genotypes, a study of the genetic diversity and genetic structure of modern and historical samples of cattle of the Kholmogor and Yaroslavl breeds was performed. The preservation of historical genomic components in modern representatives of breeds is shown.

Keywords: Yaroslavl breed, Kholmogor breed, biodiversity, genome-wide SNP genotyping.

Local livestock breeds are carriers of unique forms of variability that make a significant contribution to the global genetic diversity of animal genetic resources. Identifying at the genomic level the original alleles and unique allelic combinations of such breeds is of particular relevance for the development of breeding programs aimed at improving productive qualities while preserving the original specific alleles and haplotypes of local breeds. At the same time, the study of modern populations of local cattle breeds, even using such a powerful tool as a genome-wide SNP analysis, does not always allow to unambiguously interpret the results obtained from the point of view of the demographic history of breeds. The informative power of the research results obtained using molecular genetic methods can be significantly increased by studying historical DNA samples of animals that existed before the beginning of intensive breeding (until the middle of the XX century). The source of DNA for this kind of research can be bone samples of skulls preserved in craniological collections.

We performed a comparative study of the allele pool of two Russian cattle breeds – Kholmogor and Yaroslavl based on the analysis of genome-wide SNP genotypes of modern (n=16, n=31, respectively) and museum (n=12, n=6, respectively) samples dated to the first half of the last century. For comparison, the modern representatives of the Holstein breed (n = 15) and a historical sample of Northern Great Russian cattle (n = 1) were included into the study.

The level of allelic diversity (Ar) in the historical Kholmogor cattle was lower, while Yaroslavl cattle was higher compared to modern populations of similar breeds (Ar = 1.873±0.001 vs. 1.896±0.001, $p < 0.001$; Ar = 1.879±0.002 vs. 1.846±0.002, $p < 0.001$, respectively). There was a significant deficiency of heterozygotes in both historical livestock populations. The calculation of genetic distances showed the greatest closeness of the historical Yaroslavl cattle with the Great Russian cattle (Fst = 0.079). The modern Kholmogor cattle had significantly greater genetic similarity with the historical Kholmogor population (Fst = 0.026) compared with the value of this parameter for the historical and modern populations of Yaroslavl breed (Fst = 0.078). This suggests the effect of other selection factors on the modern population of Yaroslavl cattle. The analysis of the genetic structure showed the maintaining the historical genomic components in the modern populations of both studied breeds. The obtained data can be used for developing the programs aimed at the conservation of Yaroslavl and Kholmogor cattle breeds. The research was carried out with the support of the Russian Science Foundation, project No. 19-76-20012.

УДК 636:575 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-340-344

ЖИВОТНОВОДСТВО ЮГА РОССИИ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ НА ОСНОВЕ ВНЕДРЕНИЯ СОВРЕМЕННЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

Горлов И.Ф., Анисимова Е.Ю., Мосолова Н.И., Данилов Ю.Д., Карпенко Е.В., Княжеченко О.А.

ФГБНУ «Поволжский научно-исследовательский институт производства и переработки мясомолочной продукции» (ГНУ НИИММП), Волгоград, Россия
400131, г. Волгоград, ул. им. Рокоссовского, 6
e-mail: niimmp@mail.ru

Дана характеристика генофондов и выполнен сравнительный анализ генетического разнообразия пород сельскохозяйственных животных, разводимых в условиях засушливых регионов России с применением различных методик изучения ДНК. Выработаны инновационные предложения по оптимальной стратегии содержания и разведения пород. Для наиболее полной реализации генетического потенциала сельскохозяйственных животных разработаны новые подходы к повышению продуктивного действия кормов.

Ключевые слова: животноводство, птицеводство, селекция, кормление, полиморфизм, ДНК.

Получены новые данные по комплексной оценке племенных и продуктивных качеств овец волгоградской, эдильбаевской, карачаевской и сальской пород. Впервые проведен анализ распределения аллельных вариантов генов GDF9, GH, CAST, CLPG, MC4R у овец различного направления продуктивности. Впервые изучено влияние полиморфизма генов на воспроизводительные качества, интенсивность роста, мясную продуктивность, пищевую и биологическую ценность мяса у овец исследуемых пород. Впервые получены

данные о нуклеотидных последовательностях фрагмента D-петли мтДНК овец исходного и нового внутрипородного типа эдильбаевской породы, а также калмыцкой курдючной породы. Проведено сравнительное исследование и выявлены зависимости показателей естественной резистентности и продуктивных качеств в зависимости от генотипа сельскохозяйственных животных, районированных в засушливой зоне РФ. Даны рекомендации по использованию установленных закономерностей в системах разведения овец, и предложены перспективы дальнейших исследований в вопросе совершенствования их селекции. На основании индивидуальной бонитировки животных в племенных хозяйствах: «Ромашковский» и «Волгоград-Эдильбай» Волгоградской области, «Белозерное» Ростовской области, «Кировский» Республика Калмыкия, данных первичного зоотехнического, племенного и бухгалтерского учета, форм отчётности, дана развёрнутая характеристика основных половозрастных групп и стад в целом, которые рекомендуются для отработки интенсивной технологии производства продукции животноводства в условиях аридных территорий. Рассмотрены теоретические и практические рекомендации о влиянии породной принадлежности овец на физико-химические, биохимические и структурно-механические свойства мясного сырья. Научно-обоснованы селекционные пути совершенствования хозяйственно-биологических особенностей овец эдильбаевской породы. Разработана методика создания нового селекционного достижения – тип эдильбаевской породы овец «Поволжский» (Дата приоритета 25.02.2021, заявка №83697/7852411).

Выполнены совместные исследования с учеными Китайской народной республики по сравнительному изучению молекулярно-генетических параметров разводимых пород крупного рогатого скота на основе полногеномного анализа. Для выявления наиболее адаптированного поголовья продуктивных животных к засушливым условиям юга России выполнены исследования на основе полногеномного анализа SNP выборок племенного поголовья крупного (калмыцкая порода) и мелкого (эдильбаевская порода) рогатого скота различных генотипов. Изучены хозяйственно-биологические особенности коров симментальской, герефордской пород и их помесей, разводимых в условиях засушливых регионов. Проведен анализ содержания и кормления племенного крупного рогатого скота ангусской породы, разводимого в условиях Волгоградской области. В условиях ОАО «Кировский» (Калмыкия), изучены показатели уровня естественной резистентности и иммунобиологической реактивности организма скота калмыцкой породы в зависимости от генотипа.

Проведена оценка функционально-технологических качеств и безопасности животноводческого сырья, получаемого в засушливых условиях от сельскохозяйственных животных разных видов и пород. Изучены показатели физиологобиохимического состояния, иммунобиологического статуса, роста и развития, продуктивные и племенные качества разных видов животных, разводимых в засушливых условиях.

Для наиболее полного проявления генетического потенциала животных впервые на основе теоретических и экспериментальных исследований обоснована высокоэффективность применения в племенном птицеводстве и свиноводстве минеральных и растительных усилителей роста нового поколения (ИННОВИТ® Е 60, «МегаСтимИммуно» и «КореМикс»). Впервые получен препарат на основе штамма Bacillus amyloliquefaciens B-1895, выращенного твердофазным методом и изучено его влияние на рост, развитие ремонтного молодняка, продуктивность и качественные показатели инкубационных яиц, с целью продления срока использования кур родительского стада кросса «Хайсекс коричневый».

Разработаны модели развития отрасли мясного животноводства в условиях реализации экспортно-ориентированной стратегии АПК.

Литература

1. *Горлов И.Ф., Сложенкина М.И., Кайдулина А.А., Гришин В.С., Бармина Т.Н., Мосолова Н.И. Хозяйственно-биологические особенности коров симментальской, герефордской пород и их помесей// Молочное и мясное скотоводство. 2019. № 4. С. 16-18.*
2. *Горлов И.Ф., Анисимова Е.Ю., Мосолова Н.И., Княжеченко О.А. Инновационное развитие животноводства в засушливых регионах Юга России//Инновационное развитие аграрно-пищевых технологий: материалы Междунар. науч.-практ. конф., г. Волгоград, 4-5 июня 2020 г. / Под общ. ред. акад. РАН И.Ф. Горлова. – Волгоград: ООО «СФЕРА», 2020. – с. 12-17.*
3. *Горлов И.Ф., Сложенкина М.И. Мосолова Н.И., Николаев Д.В., Кайдулина А.А., Мосолова Д.А. Качественные показатели говядины помесных животных//Вестник Российской сельскохозяйственной науки. 2020. №. 5. P. 63-67.*
4. *Горлов И.Ф, Юлдашабаев Ю.А, Магомадов Т.А, Двалишвили В.Г, Гишларкаев Е.И. Совершенствование хозяйственно-биологических особенностей овец эдильбаевской породы: монография. Волгоград: ООО «СФЕРА», 2020. 188 с.*
5. *Иванов С.М. «Научно-практическое обоснование использования минеральных и растительных усилителей роста нового поколения в кормлении моногастричных животных»: дис…докт. биол. наук, Волгоград, 2021.*
6. *Кротова О.Е. «Научно-практическое обоснование использования пробиотических, белковых и минеральных кормовых добавок нового поколения в промышленном птицеводстве и свиноводстве»: дис…докт. биол. наук, Волгоград, 2021.*

7. *Сложенкина М.И., Мосолова Д.А. Качество говядины, получаемой от скота калмыцкой породы//Аграрно-пищевые инновации. 2020. № 1(9). С. 94-99.*
8. *Сложенкина М.И., Горлов И.Ф., Мосолова Н.И., Анисимова Е.Ю., Кротова О.Е., Черняк А.А., Николаев Д.В. Влияние инновационных методов на повышение эффективности производства и оптимизацию функциональных качеств свинины: монография. Волгоград: ООО «СФЕРА», 2020. 136 с.*
9. *Широкова Н. В. «Хозяйственно-биологические особенности и рациональное использование овец разного генетического потенциала при производстве и переработке баранины в условиях Юга России»: дис…докт. биол. наук, Волгоград, 2021.*
10. *Gorlov I.F., Fedotova G.V., Slozhenkina M.I., Zlobina E.Yu., Mosolova D.A. Nutritional value of beef from steers grown on natural pastures of arid territories//International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering (IJITEE). 2019. Vol. 9. № 1.*
11. *Gorlov I.F., Fedotova G.V., Slozhenkina M.I., Anisimova E.Yu., Kaidulina A.A., Grishin V.S., Khyazhechenko O.A., Mosolova D.A. Influence of technology of maintenance in arid conditions on efficiency of marble beef production//Potravinarstvo. 2020. Vol. 14. P. 612-618.*
12. *Gorlov I.F., Kolosov Yu.A., Shirokova N.V., Slozhenkina M.I., MosolovaN.I., Kolosov A.Yu., Getmantseva L.V., Kostyunina O.V., Anisimova E.Yu., Karpenko E.V., Yunakova I.V., Agalakova A.V. Comparative Study of Two Sheep Breeds Grown in Russia: The FABP4 Gene Polymorphism and Fat Deposition//International Journal of Agriculture and Biology. 2020. Vol. 24. № 4. P. 794-798.*
13. *Gorlov I.F., Shakhbazova O.P., Radzhabov R.G., Ivanova N.V., Anisimova E.Yu., Knyazhechenko O.A., Mosolova D.A. Meat productivity and interior features of the different genotypes of the rams Edilbay breed//IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2020. Vol. 548. Article № 082083.*
14. *Gorlov I.F., Shirokova N.V., Anisimova E.Yu., Slozhenkina M.I., Kolosov Yu.A., Natyrov A.K., Kolosov A.Yu., Mosolova N.I., Kolosova M.A., Tarchokov T.T., Mosolov A.A., Mosolova D.A., Karpenko E.V. MC4R gene polymorphism and its association with meat traits of Karachai sheep grown in Russian Federation//Journal of Applied Animal Research. 2021. Vol. 49. № 1. P. 68-74.*
15. *Gorlov I.F., ShirokovaN.V., Natyrov A.K., Kolosov Yu.A., Slozhenkina M.I., Kolosov A.Yu., Mosolova N.I., Anisimova E.Yu., Karpenko E.V., Nikolaev D.V. Growth hormone (GH) gene polymorphism and its association with meat productivity in two rough wool sheep breeds grown in Russia's dry zone// International Journal of Agriculture and Biology. 2021. Vol. 25. № 1. P. 255-259.*
16. *Slozhenkina M.I., Gorlov I.F., Shakhbazova O.P., Radjabov R.G., Ivanova N.V., Mosolova D.A., Knyazhechenko O.A., Poorghasemi M.R., Seidavi A.R. Productivity of steers of different genotypes: forecast based on interior indicators//Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2020. Vol. 72. № 6. P. 2279-2287.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-340-344

ANIMAL HUSBANDRY IN THE SOUTH OF RUSSIA: THE STATE AND PROSPECTS OF DEVELOPMENT BASED ON THE INTRODUCTION OF MODERN MOLECULAR GENETIC TECHNOLOGIES

Gorlov I.F., Anisimova E.Yu., Mosolova N.I., Danilov Yu.D., Karpenko E.V., Knyazhechenko O.A.

Volga Region Scientific Research Institute of Meat-and-Milk Production and Processing (NIIMMP), Volgograd, Russia
6, Rokosovsky street, Volgograd, Russian Federation, 400131
e-mail: niimmp@mail.ru

The characteristics of gene pools are given and a comparative analysis of the genetic diversity of breeds of farm animals bred in the conditions of arid regions of Russia using various methods of studying DNA is performed. Innovative proposals on the optimal strategy for the maintenance and breeding of breeds have been developed. For the most complete realization of the genetic potential of farm animals, new approaches have been developed to increase the productive effect of feed.

Keywords: animal husbandry, poultry breeding, breeding, feeding, polymorphism, DNA.

New data on a comprehensive assessment of the breeding and productive qualities of sheep of the Volgograd, Edilbay, Karachaevskaya and Salskaya breeds have been obtained. For the first time, an analysis of the distribution of allelic variants of the GDF9, GH, CAST, CLPG, MC4R genes in sheep of different productivity directions was carried out. The influence of gene polymorphism on reproductive qualities, growth intensity, meat productivity, nutritional and biological value of meat in sheep of the studied breeds was studied for the first time. For the first time, data on the nucleotide sequences of the fragment of the D-loop of mtDNA of sheep of the original and new intra-breed types of the Edilbay breed, as well as the Kalmyk chicken breed, were obtained. A comparative study was conducted and the dependences of the indicators of natural resistance and productive qualities were revealed depending

on the genotype of farm animals zoned in the arid zone of the Russian Federation. Recommendations on the use of established patterns in sheep breeding systems are given, and prospects for further research in improving their breeding are proposed. Based on the individual bonitization of animals in breeding farms: "Romashkovsky" and "Volgograd-Edilbay" of the Volgograd region, "Belozernoye" of the Rostov region, "Kirovsky" of the Republic of Kalmykia, data from primary zootechnical, breeding and accounting records, reporting forms, a detailed description of the main sex and age groups and herds in general is given, which are recommended for testing intensive technology for the production of livestock products in arid territories. Theoretical and practical recommendations on the influence of the breed affiliation of sheep on the physico-chemical, biochemical and structural-mechanical properties of meat raw materials are considered. The selection ways of improving the economic and biological characteristics of sheep of the Edilbay breed are scientifically justified. The method of creating a new selection achievement – the type of the Edilbay sheep breed "Povolzhsky" (Priority date 25.02.2021, application No. 83697/7852411) has been developed.

Joint research was carried out with scientists of the People's Republic of China on the comparative study of molecular and genetic parameters of bred cattle breeds on the basis of genome-wide analysis. To identify the most adapted livestock of productive animals to the arid conditions of the south of Russia, studies were carried out on the basis of a full-genomic analysis of SNP samples of breeding livestock of large (Kalmyk breed) and small (Edilbay breed) cattle of various genotypes. The economic and biological features of cows of the Simmental, Hereford breeds and their hybrids bred in arid regions are studied. The analysis of the content and feeding of breeding cattle of the Angus breed, bred in the conditions of the Volgograd region, is carried out. In the conditions of JSC "Kirovsky" (Kalmykia), the indicators of the level of natural resistance and immunobiological reactivity of the organism of Kalmyk cattle depending on the genotype were studied.

An assessment of the functional and technological qualities and safety of livestock raw materials obtained in arid conditions from farm animals of different species and breeds was carried out. The indicators of the physiological and biochemical state, immunobiological status, growth and development, productive and breeding qualities of various animal species bred in arid conditions were studied.

For the most complete manifestation of the genetic potential of animals, for the first time, on the basis of theoretical and experimental studies, the highly effective use of mineral and plant growth enhancers of a new generation (INNOVIT ® E 60, "MegaStimImmuno" and "Koremix") in breeding poultry and pig breeding is justified. For the first time, a preparation based on the Bacillus amyloliquefaciens B-1895 strain grown by the solid-phase method was obtained and its effect on the growth, development of repair young animals, productivity and quality indicators of hatching eggs was studied in order to extend the use of chickens of the parent herd of the cross "Hysex brown".

Models of the development of the meat livestock industry in the context of the implementation of the export-oriented strategy of the agro-industrial complex have been developed.

References

1. *Gorlov I. F., Slozhenkina M. I., Kaidulina A. A., Grishin V. S., Barmina T. N., Mosolova N. I. Economic and biological features of cows of the Simmental, Hereford breeds and their hybrids/ / Dairy and meat cattle breeding. 2019. No. 4. pp. 16-18.*
2. *Gorlov I. F., Anisimova E. Yu., Mosolova N. I., Knyazhechenko O. A. Innovative development of animal husbandry in the arid regions of Southern Russia//Innovative development of agricultural and food technologies: materials of the International Scientific and Practical Conference, Volgograd, June 4-5, 2020 / Under the general ed. akad. RAS I. F. Gorlova. - Volgograd: LLC "SPHERE", 2020. - p. 12-17.*
3. *Gorlov I. F., Slozhenkina M. I. Mosolova N. I., Nikolaev D. V., Kaidulina A. A., Mosolova D. A. Qualitative indicators of beef of crossbred animals//Bulletin of the Russian Agricultural Science. 2020. No. 5. p. 63-67.*
4. *Gorlov I. F, Yuldashabaev Yu. A., Magomadov T. A, Dvalishvili V. G, Gishlarkaev E. I. Improving the economic and biological characteristics of sheep of the Edilbaev breed: monograph. Volgograd: LLC "SPHERE", 2020. 188 p.*
5. *Ivanov S. M. "Scientific and practical justification of the use of mineral and plant growth enhancers of a new generation in feeding monogastric animals": dis ... doct. biol. nauk, Volgograd, 2021.*
6. *Krotova O. E. "Scientific and practical justification of the use of probiotic, protein and mineral feed additives of a new generation in industrial poultry and pig breeding": dis ... doct. biol. nauk, Volgograd, 2021.*
7. *Slozhenkina M. I., Mosolova D. A. The quality of beef obtained from Kalmyk cattle//Agricultural and food innovations. 2020. No. 1(9). pp. 94-99.*
8. *Slozhenkina M. I., Gorlov I. F., Mosolova N. I., Anisimova E. Yu., Krotova O. E., Chernyak A. A., Nikolaev D. V. The influence of innovative methods on improving production efficiency and optimizing the functional qualities of pork: monograph. Volgograd: LLC "SPHERE", 2020. 136 p.*
9. *Shirokova N. V. "Economic and biological features and rational use of sheep of different genetic potential in the production and processing of mutton in the conditions of the South of Russia": dis ... doct. biol. nauk, Volgograd, 2021.*

10. *Gorlov I.F., Fedotova G.V., Slozhenkina M.I., Zlobina E.Yu., Mosolova D.A. Nutritional value of beef from steers grown on natural pastures of arid territories//International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering (IJITEE). 2019. Vol. 9. № 1.*
11. *Gorlov I.F., Fedotova G.V., Slozhenkina M.I., Anisimova E.Yu., Kaidulina A.A., Grishin V.S., Khyazhechenko O.A., Mosolova D.A. Influence of technology of maintenance in arid conditions on efficiency of marble beef production//Potravinarstvo. 2020. Vol. 14. P. 612-618.*
12. *Gorlov I.F., Kolosov Yu.A., Shirokova N.V., Slozhenkina M.I., MosolovaN.I., Kolosov A.Yu., Getmantseva L.V., Kostyunina O.V., Anisimova E.Yu., Karpenko E.V., Yunakova I.V., Agalakova A.V. Comparative Study of Two Sheep Breeds Grown in Russia: The FABP4 Gene Polymorphism and Fat Deposition//International Journal of Agriculture and Biology. 2020. Vol. 24. № 4. P. 794-798.*
13. *Gorlov I.F., Shakhbazova O.P., Radzhabov R.G., Ivanova N.V., Anisimova E.Yu., Knyazhechenko O.A., Mosolova D.A. Meat productivity and interior features of the different genotypes of the rams Edilbay breed//IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2020. Vol. 548. Article № 082083.*
14. *Gorlov I.F., Shirokova N.V., Anisimova E.Yu., Slozhenkina M.I., Kolosov Yu.A., Natyrov A.K., Kolosov A.Yu., Mosolova N.I., Kolosova M.A., Tarchokov T.T., Mosolov A.A., Mosolova D.A., Karpenko E.V. MC4R gene polymorphism and its association with meat traits of Karachai sheep grown in Russian Federation//Journal of Applied Animal Research. 2021. Vol. 49. № 1. P. 68-74.*
15. *Gorlov I.F., ShirokovaN.V., Natyrov A.K., Kolosov Yu.A., Slozhenkina M.I., Kolosov A.Yu., Mosolova N.I., Anisimova E.Yu., Karpenko E.V., Nikolaev D.V. Growth hormone (GH) gene polymorphism and its association with meat productivity in two rough wool sheep breeds grown in Russia's dry zone// International Journal of Agriculture and Biology. 2021. Vol. 25. № 1. P. 255-259.*
16. *Slozhenkina M.I., Gorlov I.F., Shakhbazova O.P., Radjabov R.G., Ivanova N.V., Mosolova D.A., Knyazhechenko O.A., Poorghasemi M.R., Seidavi A.R. Productivity of steers of different genotypes: forecast based on interior indicators//Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2020. Vol. 72. № 6. P. 2279-2287.*

УДК 636.068:636.083.31 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-344-345

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ К ПРИЖИЗНЕННОЙ ОЦЕНКЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПУТЕМ 3D-ВИЗУАЛИЗАЦИИ ХОЗЯЙСТВЕННО-БИОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ЖИВОТНЫХ

Колпаков В.И., Ручай А.Н.

ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук»
Россия, 460000, Оренбургская область, г. Оренбург, ул. 9 Января, д. 29.
e-mail: vkolpakov056@yandex.ru

Представлены новейшие направления исследований, ориентированных на увеличение производства высококачественной говядины путем прижизненной оценки продуктивного потенциала крупного рогатого скота за счет включения молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с хозяйственно-полезными признаками, и знаниями о качественном составе убойных туш и отрубов.

Ключевые слова: животноводство, мясное скотоводство, прижизненная оценка, прогнозирование, генотипирование, трехмерная форма тела, коммерческие отруба, качество мяса

Для повышения производительности в животноводстве необходима объективная и каждодневная оценка продуктивности животных на промышленных животноводческих комплексах. Учитывая трудоемкость традиционных подходов к экспертному оцениванию, разработка новых методов автоматической оценки и прогнозирования продуктивности животных с учетом современных технологий в области инженерии является значимой научной и практически важной задачей.

Особенно это касается прогнозирования продуктивности животного, поскольку именно этот фактор определяет эффективность данной отрасли животноводства.

Проведение популяционно-генетических и полногеномных ассоциативных исследований для идентификации генов-кандидатов хозяйственно-полезных признаков крупного рогатого скота – это настоящая проблема для хозяйств, занимающихся выращиванием и откормом крупного рогатого скота. Для избежание рутинной работы и больших затрат необходимо разработать новые методы автоматической оценки и

прогнозирования продуктивности на основе внешних признаков животных. Это позволит улучшить качественные и количественные характеристики в животноводстве.

Существующие системы бесконтактных измерений характеристик животных основаны на инженерных технологиях двадцатилетней давности и используют исключительно линейные характеристики для субъективной экспертной оценки. Методы компьютерного зрения и машинного обучения, как новые технологии, лягут в основу автоматизированной, бесконтактной, не стрессовой и экономически эффективной системы для коммерческой оценки и прогнозирования продуктивности животных.

UDC 636.068:636.083.31 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-344-345

DEVELOPMENT OF NEW APPROACHES TO THE LIFETIME ASSESSMENT OF CATTLE BY 3D VISUALIZATION OF THE ECONOMIC, BIOLOGICAL AND GENETIC CHARACTERISTICS OF ANIMALS

Kolpakov V.I., Ruchay A.N.

Federal Research Center of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences, Orenburg. Russia, 460000, Orenburg region, Orenburg, 9 January st., 29.

The article presents the latest research directions aimed at increasing the production of high-quality beef by means of a lifetime assessment of the productive potential of cattle due to the inclusion of molecular genetic markers associated with economically useful traits and knowledge about the qualitative composition of slaughter carcasses and cuts.

Keywords: animal husbandry, beef cattle breeding, lifetime assessment, forecasting, genotyping, three-dimensional body shape, commercial cuts, meat quality.

To increase productivity in animal husbandry, an objective and everyday assessment of the productivity of animals in industrial livestock complexes is necessary. Taking into account the complexity of traditional approaches to expert assessment, the development of new methods for automatic assessment and forecasting of animal productivity, taking into account modern technologies in the field of engineering, is a significant scientific and practically important task. This is especially true for predicting the productivity of an animal, since this factor determines the effectiveness of this branch of animal husbandry.

Conducting population-genetic and genome-wide associative studies to identify candidate genes for economically useful traits of cattle is a real problem for farms engaged in the cultivation and fattening of cattle. To avoid routine work and high costs, it is necessary to develop new methods for automatic assessment and forecasting of productivity based on external signs of animals. This will improve the qualitative and quantitative characteristics in animal husbandry.

The existing systems of non-contact measurements of animal characteristics are based on engineering technologies of twenty years ago and use exclusively linear characteristics for subjective expert evaluation. Computer vision and machine learning methods, as new technologies, will form the basis of an automated, contactless, non-stressful and cost-effective system for commercial evaluation and forecasting of animal productivity.

УДК 575.224.22 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-345-347

КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ РОССИЙСКИХ ПОРОД КРС И ОВЕЦ ДЛЯ ПОИСКА НУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ АДАПТАЦИИ И ЭКОНОМИЧЕСКИ-ВАЖНЫХ ФЕНОТИПОВ НА ГЕННОМ УРОВНЕ

Ларкин Д.М.

Федеральный Исследовательский Центр Институт Цитологии и Генетики СО РАН
630090, Новосибирск, пр-кт Лаврентьева 10.
e-mail:dmlarkin@gmail.com

Наша работа показывает необходимость применения комплексного подхода для определения конкретных нуклеотидных замен, которые могут быть использованы для увеличения эффективности и/или акклиматизации пород сельскохозяйственных животных в российских условиях с помощью генетических технологий.

Ключевые слова: российские породы, КРС, овцы, эволюция, нуклеотидные замены, акклиматизация, экономически-важные признаки

Развитие генетических технологий и баз данных по геномам животных предоставляют нам новые, практически беспрецедентные, возможности для точного выявления генетических вариантов, отвечающих за различные признаки животных. В случае сельскохозяйственных животных стало возможным определение как генетических вариантов, отвечающих за адаптации к локальным условиям среды (акклиматизацию), так и тех вариантов, которые реагируют на искусственный отбор человеком и, таким образом, влияют на экономически-важные признаки. В нашей работе мы сфокусировались на выявлении таких генетических вариантов у группы турано-монгольских пород крупного рогатого скота и сибирских пород овец. К настоящему времени мы отсеквенировали более 250 геномов нескольких малоизученных пород из России, включая бурятскую и алтайскую популяции крупного рогатого скота (КРС), вагью, забайкальскую, алтайскую, тувинскую и бурятскую породы овец. Анализ данных геномов КРС проводится в рамках международного проекта «1000 геномов быков», что позволяет нам точно определить историю каждого нуклеотида в геномах российских пород. Мы обнаружили ряд следов отбора и специфические кандидатные нуклеотидные замены, которые отвечают за экономически-важные и адаптивные признаки у российских пород. Для ранжирования кодирующих нуклеотидных замен, возникающих в ответ на холодный климат, были применены алгоритмы поиска следов конвергентной эволюции в геноме якутского скота и 11 видов холодостойких, гибернирующих и глубоко-ныряющих животных. В результате был подтвержден сигнал конвергентной эволюции в гене *NRAP*, обнаруженный нами ранее [1]. Кроме того, были выявлены новые конвергентные кодирующие замены в ~20-и генах якутского скота, включая найденные нами ранее гены, находящиеся под давлением отбора в ответ на адаптацию к локальным условиям обитания. В случае российской ярославской породы КРС нами был найден гаплотип, содержащий породо-специфическую кодирующую мутацию в эволюционно-консервативном гене *KAT6B*, который влияет на структуру скелета и вес животных этой породы, таким образом оказывая влияние на экономически-важные признаки.

Наша работа показывает необходимость применения комплексного подхода для определения конкретных нуклеотидных замен, которые могут быть использованы для увеличения эффективности и/или акклиматизации пород сельскохозяйственных животных в российских условиях с помощью генетических технологий. Этот подход должен использовать как фенотипическое внутрипородное, так межпородное и межвидовое разнообразие, которые проявляются в разных климатических зонах Российской Федерации.

Проект финансируется грантом Российского Научного Фонда №19-76-20026.

Литература

Buggiotti L., Yurchenko A.A., Yudin N.S., Vander Jagt C.J., Vorobieva N.V., Kusliy M.A., Vasiliev S.K., Rodionov A.N., Boronetskaya O.I., Zinovieva N.A., Graphodatsky A.S., Daetwyler H.D., Larkin D.M. Demographic history, adaptation, and NRAP convergent evolution at amino acid residue 100 in the world northernmost cattle from Siberia. Mol. Biol. Evol. 2021. Vol. 38. № 8. P. 3093-3110.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-345-347

COMPREHENSIVE ANALYSIS OF THE GENOMES OF RUSSIAN CATTLE AND SHEEP BREEDS TO FIND NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS TO IMPROVE ADAPTATION AND ECONOMICALLY IMPORTANT PHENOTYPES AT THE GENE LEVEL

Larkin D.M.

Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS.
630090, Novosibirsk, 10 Lavrentyev Ave.
e-mail:dmlarkin@gmail.com

Our work shows the need to apply an integrated approach to identify specific nucleotide polymorphisms that can be used to increase the efficiency and/or acclimatization of farm animal breeds in environmental conditions of Russia using genetic technologies.

Keywords: Russian breeds, cattle, sheep, evolution, nucleotide polymorphisms, acclimatization, economically important traits

The development of genetic technologies and databases containing animal genomes provide us with new, almost unprecedented, opportunities for the accurate identification of genetic variants responsible for various animal traits. In the case of livestock, it has become possible to identify both genetic variants responsible for adaptation to local environmental conditions (acclimatization) and those variants that respond to artificial human selection and thus affect economically important traits. In our work, we focused on identifying such genetic variants in a group of Turano-Mongolian cattle breeds and Siberian breeds of sheep. To date, we have sequenced more than 250 genomes of several understudied breeds from Russia, including the Buryat and Altai cattle populations, Wagyu, Baikal, Altai, Tuva and Buryat breeds of sheep. The analysis of cattle genome data is carried out within the framework of the international project "1000 Bull Genomes", which allows us to accurately determine the history of each nucleotide in the genomes of Russian cattle breeds. We found a number of signatures of selection and specific candidate nucleotide substitutions, which are responsible for economically important and adaptive traits in Russian breeds. To rank coding nucleotide substitutions that occur in response to cold climates, algorithmic approaches were used to search for signatures of convergent evolution in the genome of Yakut cattle and 11 species of cold-resistant, hibernating, and deep-diving animals. As a result, the signal of convergent evolution in the *NRAP* gene, which we found earlier [1] has been confirmed. In addition, new convergent coding substitutions were identified in ~20 genes of Yakut cattle, including genes we found earlier to be under selective pressure in response to adaptation to local habitat conditions. In the case of the Russian Yaroslavl cattle breed, we found a haplotype containing a breed-specific coding variant in the evolutionarily conserved *KAT6B* gene, which affects the structure of the skeleton and the weight of animals of this breed, thus influencing economically important traits.

Our work shows the need to apply an integrated approach to identify specific nucleotide polymorphisms that can be used to increase the efficiency and/or acclimatization of livestock breeds to environmental conditions of Russia using genetic technologies. This approach should use phenotypic intrabreed, interbreed and interspecies diversity, which are expressed in different climatic zones of the Russian Federation.

The project is funded by a grant from the Russian Science Foundation No. 19-76-20026.

References

Buggiotti L., Yurchenko A.A., Yudin N.S., Vander Jagt C.J., Vorobieva N.V., Kusliy M.A., Vasiliev S.K., Rodionov A.N., Boronetskaya O.I., Zinovieva N.A., Graphodatsky A.S., Daetwyler H.D., Larkin D.M. Demographic history, adaptation, and NRAP convergent evolution at amino acid residue 100 in the world northernmost cattle from Siberia. Mol. Biol. Evol. 2021. Vol. 38. № 8. P. 3093-3110.

УДК 636.013 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-347-349

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ МОНИТОРИНГА И СОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ НА ПРИМЕРЕ АБОРИГЕННЫХ КОЗ АЛТАЙСКИХ ГОР МОНГОЛИИ

Пискунов А.К., Воронкова В.Н., Бекетов С.В., Столповский Ю.А.

Институт общей генетики им.Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия
119991, Москва, ул. Губкина, д. 3
e-mail: iogen(at)vigg.ru

На примере домашней козы рассмотрено происхождение генетических ресурсов доместицированных видом животных, их значение в развитии фундаментальной биологии и экономики. Представлены данные о генетических рисках и структуре популяций локальных пород коз, обитающих на территории монгольского Алтая, полученные путем анализа SNP-генотипов, микросателлитных последовательностей, а также митохондриального генома и генов Y-хромосомы.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, адаптация, коза

Совместная эволюция козы и человека за 12 тысяч лет сформировала генетические механизмы физиологической и поведенческой адаптивности, позволившие козам стать важным звеном в жизни многих народов. Причем, значимость этих животных в экономике непрерывно растёт, и в некоторых странах составляет её основу. Одновременно с этим, усилия по увеличению продуктивности спровоцировали сокращение генетического разнообразия коз, которое вызывает беспокойство как исследователей живой природы, так и специалистов экономико-политического сектора, а также этнологов. Одна из основных причин заключается в утрате локальных пород, генетические ресурсы которых обеспечивают стабильность вида в непрерывно изменяющихся условиях внешней среды, в том числе, климата.

В настоящее время фокус исследований в генетике коз и других видов доместицированных животных смещается от продуктивности к охране генетического разнообразия. Можно предположить что его источники сохранились в регионах, избежавших масштабных селекционных программ. В этой работе мы исследовали структуру, происхождение и оценили генетические риски пяти локальных пород коз Алтайский гор в Монголии: (гурван эгч, дархатской, бурах завхан, ульгий уулан, алтай уулан). Эти популяции служат примером приспособляемости к экстремальным геоклиматическим условиях, а также важной роли аборигенных пород в жизни коренных народов.

Были использованы три подхода, основанных на анализе: (i) однонуклеотидных полиморфизмов, (ii) микросателлитных повторов, (iii) ДНК митохондрий и У-хромосомы. Согласно полученных значениям эффективной численности и аллельного разнообразия, эти популяции формально не могут быть отнесены к зоне генетического риска. В то же время, межпородная дифференциация и разнообразие монгольских коз оказались крайне низкими в сравнении с внутрипородным разнообразимем, а внутри пород были выявлены генетические обособленные группы. Таким образом, эти популяции не обладают автономностью, характеристики пород размыты, а сами популяции неоднородны. По всей видимости, видимые признаки благополучия, - высокая фактическая и эффективная численность, - могут маскировать критическую ситуацию: вероятную потерю сочетаний аллелей, определяющих адаптивность к локальным условиям.

Биологические механизмы этой адаптивности до сих пор не описаны. Таким образом, охрана и дальнейшее изучение генетических ресурсов аборигенных коз принципиально важны не только с экономической и социокультурной точек зрения, но также представляют существенный интерес для фундаментальной генетики и физиологии.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-347-349

DEVELOPMENT OF A SYSTEM FOR MONITORING AND PRESERVATION OF GENETIC RESOURCES ON THE EXAMPLE OF ABORIGENOUS GOATS OF THE ALTAI MOUNTAINS OF MONGOLIA

Piskunov A.K., Voronkova V.N., Beketov S.V., Stolpovsky Yu.A.

Institute of General Genetics named after N.I. Vavilov Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119991, Moscow, st. Gubkina, 3
e-mail: iogen (at) vigg.ru

The origin of genetic resources domesticated by a species of animals, their importance in the development of fundamental biology and economics is considered on the example of a domestic goat. The data on genetic risks and population structure of local goat breeds inhabiting the territory of Mongolian Altai, obtained by analyzing SNP genotypes, microsatellite sequences, as well as the mitochondrial genome and genes of the Y chromosome, are presented.

Key words: genetic diversity, adaptation, goat

The joint evolution of the goat and man over 12 thousand years has formed the genetic mechanisms of physiological and behavioral adaptability, which have allowed goats to become an important link in the life of many peoples. Moreover, the importance of these animals in the economy is constantly growing, and in some countries forms its basis. At the same time, efforts to increase productivity have triggered a decline in the genetic diversity of

goats, which is of concern to wildlife researchers, as well as experts in the economic and political sector, as well as ethnologists. One of the main reasons is the loss of local breeds, the genetic resources of which ensure the stability of the species in the constantly changing environmental conditions, including the climate.

Currently, the focus of research in the genetics of goats and other species of domesticated animals is shifting from productivity to the protection of genetic diversity. It can be assumed that its sources have survived in regions that have escaped large-scale breeding programs. In this work, we investigated the structure, origin and assessed the genetic risks of five local breeds of goats in the Altai Mountains in Mongolia: (gurvan egch, darkhat, burakh zavkhan, ulgiy uulan, altai uulan). These populations exemplify adaptability to extreme geoclimatic conditions, as well as the important role of indigenous breeds in the lives of indigenous peoples.

Three approaches based on the analysis were used: (i) single nucleotide polymorphisms, (ii) microsatellite repeats, (iii) mitochondrial and Y-chromosome DNA. According to the obtained values of the effective abundance and allelic diversity, these populations formally cannot be assigned to the zone of genetic risk. At the same time, the interbreed differentiation and diversity of Mongolian goats turned out to be extremely low in comparison with the intrabreed diversity, and genetic isolated groups were identified within the breeds. Thus, these populations do not have autonomy, the characteristics of the breeds are blurred, and the populations themselves are heterogeneous. Apparently, visible signs of well-being - high actual and effective numbers - can mask a critical situation: the probable loss of combinations of alleles that determine adaptability to local conditions.

The biological mechanisms of this adaptability have not yet been described. Thus, the protection and further study of the genetic resources of indigenous goats are fundamentally important not only from an economic and sociocultural point of view, but are also of significant interest for fundamental genetics and physiology.

УДК 636.39.034:575.22 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-349-352

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПО STR-МАРКЕРАМ И ПОКАЗАТЕЛИ ПРОДУКТИВНОСТИ КАРАЧАЕВСКИХ КОЗ В РАЗНЫХ ЗОНАХ РАЗВЕДЕНИЯ

Селионова М.И., Айбазов А.М.М., Мамонтова Т.В., Харзинова В.Р., Зиновьева Н.А.

*Российский государственный аграрный университет -
Московская сельскохозяйственная академия им. К.А.Тимирязева, Москва, Россия,
127550, Москва, ул. Тимирязевская, 41,
e-mail: m_selin@mail.ru
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Московская область, Россия,
142132, г/о Подольск, п. Дубровицы, 60*

Получены данные, свидетельствующие о различиях по живой массе и показателям экстерьера карачаевских коз разводимых в горной, предгорной и равнинно-холмистой зонах. Установлены высокий уровень генетического разнообразия и четкая генетическая дифференциация популяций из разных зон разведения на основе STR-маркеров.

Ключевые слова: карачаевские козы, показатели экстерьера, зоны разведения, генетическая дифференциация, STR-маркеры

Козоводство является источником мяса, молока, шерсти, пуха и кожевенного сырья. В мире насчитывается 1,2 млрд. коз 635 пород, которые разводятся в 170 странах (http://www.fao.org/dad-is), в России содержится около 2,1 млн. коз 10 пород (1). В последние годы все большее распространение приобретают козы молочно-мясо-шерстного направления, среди которых интерес для изучения по микросателлитным маркерам представляют карачаевские козы (2). Особенностью их разведения является единый ареал обитания и случаи гибридизации с диким сородичем – кавказским туром, что возможно, оказывает влияние на признаки продуктивности и особенности генофонда (3).

Целью исследования явилось изучение признаков продуктивности карачаевских коз, разводимых в разных зонах, а также внутрипородная генетическая дифференциация на основе STR-маркеров.

Козлята в разные периоды онтогенеза характеризовались следующими параметрами живой массы:

при рождении одинцы весили 3,8 кг, двойни – 2,6 кг; в 4 месячном возрасте – 17,6 кг, в 8 месяцев – 33,4 кг соответственно. Различий по живой массе козлят при рождении из разных зон не выявлено, однако к 4 месячному возрасту молодняк, из равнинно-холмистой зоны, имел преимущество на 4,65 % над сверстниками из горной, которое сохранилось к 8 месячному возрасту и составило 6,44% ($p<0,05$). Козы в среднем весили 44,56 кг, при этом выявлено преимущество на 7,4% ($p<0,05$) особей из равнинно-холмистой зоны.

У коз в среднем по трем популяциям высота в холке составила – 62,5 см; в крестце – 65,5 см; косая длина туловища – 64,8 см; обхват груди за лопатками – 83,2 см, ширина груди – 18,9 см, глубина груди – 29,6 см, ширина в маклоках – 15,6 см, обхват пясти – 8,9 см, длина головы – 21,5 см, ширина лба – 12,4 см.

Индексы телосложения у молодняка в возрасте 4 и 8 месяцев были следующими: ростовой – 104,7; длинноногости – 52,7; растянутости – 102,4; грудной – 63,7; тазо-грудной – 123,8; сбитости – 130,0; массивности – 133,0; костистости – 14,1. У взрослых коз соответственно 104,7; 52,7; 102,4; 63,7; 123,8; 130,0; 133,0 и 14,1.

Полученные данные позволяют заключить, что в горной зоне большее распространение получили высоконогие и легкие животные, в равнинно-холмистой – более массивные. Выявленные различия, по-видимому, обусловлены разной двигательной пищевой активностью коз при поиске кормов в зонах на различной высоте над уровнем моря.

Исследование биоразнообразия по 16 локусам STR-маркеров выявило, что карачаевские козы характеризовались высоким уровнем генетического разнообразия (табл. 1). Достоверного отклонения наблюдаемой гетерозиготности от ожидаемой в обеих популяциях выявлено не было.

Таблица 1 – Характеристика генетического разнообразия карачаевских коз разных зон разведения

Показатель		Зона, популяция	
		предгорная KRCH_Z	горная KRCH_K
Среднее число	аллелей на локус (N_A)	7,308±0,763	8,769±0,671
	информативных аллелей (N_I)	4,923±0,415	5,077±0,473
	эффективных аллелей на локус (N_E)	4,137±0,489	4,740±0,487
Аллельное разнообразие (A_R)		7,308±0,763	7,826±0,577
Наблюдаемая гетерозиготность (H_O)		0,718±0,059	0,745±0,059
Ожидаемая гетерозиготность (H_E)		0,693±0,053	0,735±0,051
Коэффициент инбридинга (F_{IS})		-0,037	-0,003

Результаты пространственного распределения на основе анализа главных компонент и генетической структуры исследованных популяций коз выявили их четкую дифференциацию, при этом в обеих популяциях отмечалась адмиксия.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РНФ в рамках проекта № 19-76-20006

Литература

1. *Дунин И.М., Амерханов Х.А., Сафина Г.Ф., Григорян Л.Н., Хататаев С.А., Хмелевская Г.Н. Козоводство России и его племенные ресурсы. Ежегодник по племенной работе в овцеводстве и козоводстве в хозяйствах Российской Федерации (2019 год). Москва: ФГБНУ ВНИИплем, Лесные Поляны, 2020. – С. 323-325.*
2. *Dakin E.E., Avise J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis // Heredity. 2004. Vol. 93. P. 504-509.*
3. *Айбазов А.М.М., Мамонтова Т.В. Некоторые продуктивные и биологические показатели потомства, полученного от скрещивания западно-кавказского тура и карачаевских коз // Сб. научн. тр. Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства, Ставрополь, СНИИЖК, 2014, Т. 1, Вып. 7. – С. 50-55.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-349-352

GENETIC DIFFERENTIATION BY STR-MARKERS AND PRODUCTIVITY TRAITS OF KARACHAEV GOATS FROM DIFFERENT BREEDING ZONES

Selionova M.I., Aibazov A.M.M, Mamontova T.V., Kharzinova V.R., Zinovieva N.A.

Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia.
127550 Timiryazevskaya St., 41
e-mail: m_selin@mail.ru
Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Moscow Region, Russia,
142132 d/o Podolsk, p. Dubrovitsy, 60

Data have been obtained indicating differences by the live weight and exterior appearance of Karachaev goats bred in the mountain area, foothill, and plain-hill zone. A high level of genetic diversity and a clear genetic differentiation of populations from different breeding zones on the basis of STR-markers have been established.

Key words: Karachaev goats, exteriors, breeding areas, genetic differentiation, STR-markers

Goat breeding is a source of meat, milk, wool, down and leather raw materials. There are 1.2 billion goats of 635 breeds worldwide, which are bred in 170 countries (http://www.fao.org/dad-is), in Russia there are about 2.1 million goats of 10 breeds (1). In recent years, dairy-meat-wool goats have become increasingly common, among which Karachaev goats are of interest for study by microsatellite markers (2). The peculiarity of their breeding is a single habitat and cases of hybridization with a wild relative, the Caucasian tur, which probably influences the productivity traits and features of the gene pool (3).

The aim of the study was to investigate the productivity traits of Karachaev goats bred in different zones, as well as intra-breed genetic differentiation based on STR markers.

Young goats in different periods of ontogenesis were characterized by the following parameters of live weight: at birth, the singlets weighed 3.8 kg, twins - 2.6 kg; at 4 months of age - 17.6 kg, at 8 months - 33.4 kg, respectively. There were no differences in birth weights of goats from different areas but by 4 months of age the young goats from the lowland and hilly areas had an advantage of 4.65% over their peers from the highland areas which remained at 8 months of age at 6.44% (p<0,05). Goats averaged 44.56 kg, with a 7.4% (p<0.05) advantage of individuals from the plain-hilly zone.

Goats averaged 62.5 cm at withers height; 65.5 cm at rump height; 64.8 cm body length; 83.2 cm thoracic perimeter, 18.9 cm thoracic width, 29.6 cm thoracic depth, 15.6 cm rump width, 8.9 cm anterior shin perimeter, 21.5 cm head length, and 12.4 cm head width in three populations.

Body indexes in young goats at 4 and 8 months of age were as follows: height - 104.7; long-legged - 52.7; elongated - 102.4; thoracic - 63.7; pelvic-thoracic - 123.8; compacted - 130.0; massive - 133.0; bones - 14.1. In adult goats, 104.7; 52.7; 102.4; 63.7; 123.8; 130.0; 133.0; and 14.1, respectively.

Table 1 - Characteristics of genetic diversity of Karachaev goats in different breeding areas

Traits		Area, population	
		The Foothill KRCH_Z	The Mountain KRCH_K
Average number of	alleles per locus (N_A)	7,308±0,763	8,769±0,671
	informative alleles per locus (N_I)	4,923±0,415	5,077±0,473
	effective alleles per locus (N_E)	4,137±0,489	4,740±0,487
Allelic diversity (A_R)		7,308±0,763	7,826±0,577
Observed heterozygosity (H_O)		0,718±0,059	0,745±0,059
Expected heterozygosity (H_E)		0,693±0,053	0,735±0,051
Inbreeding rate (F_{IS})		-0,037	-0,003

The data obtained allow us to conclude that in the mountain area, tall-legged and lighter animals are more common, while in the plain-hill zone, more massive animals are more common. The revealed differences are apparently caused by the different motor food activity of goats when searching for fodder in zones at different altitudes above sea level.

The study of biodiversity at 16 loci of STR markers revealed that Karachaev goats were characterized by a high level of genetic diversity (Table 1). No significant deviation of the observed heterozygosity from the expected one was found in both populations.

The results of the spatial distribution based on principal component analysis and the genetic structure of the studied goat populations revealed their clear differentiation, with admixture observed in both populations.

The research was funded by the Russian Science Foundation, Project No. 19-76-20006

References

1. *Dunin I.M., Amerkhanov H.A., Safina G.F., Grigoryan L.N., Khatatayev S.A., Khmelevskaya G.N. Goat breeding in Russia and its breeding resources. Yearbook on breeding work in sheep and goat breeding in farms of the Russian Federation (2019). Moscow: FGBNU VNIIPlem, Lesnye Polyany, 2020. P. 323-325.*
2. *Dakin E.E., Avise J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis // Heredity. 2004. Vol. 93. P. 504-509.*
3. *Aibazov A.M.M., Mamontova T.V. Some productive and biological indicators of offspring obtained from crossing West Caucasian tur and Karachaev goats // Collection of scientific papers of Stavropol Research Institute of Animal Husbandry and Fodder Production, Stavropol, SNIIZhK, 2014, Vol. 1, Issue 7. P. 50-55.*

УДК 637.12.05.055:636.2.034 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-352-354

ПОИСК ПОЛНОГЕНОМНЫХ АССОЦИАЦИЙ ДЛЯ СОДЕРЖАНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В МОЛОКЕ КОРОВ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ ИНФРАКРАСНЫХ СПЕКТРОВ

Сермягин А.А., Гладырь Е.А., Игнатьева Л.П., Лашнева И.А., Косицин А.А., Артемьева О.А., Ермилов А.Н., Зиновьева Н.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»
Подольск, Россия
142132, Московская область, Г.о. Подольск, пос. Дубровицы 60
e-mail: alex_sermyagin85@mail.ru

Получены первые результаты анализа полногеномных ассоциаций для жирнокислотного состава молока коров голштинизированной черно-пестрой и голштинской пород России. Установлены регионы в геноме (QTL), сопряженные с содержанием массовой доли жира, синтезом жирных кислот, функциональными показателями строения вымени и конечностей, признаками фертильности.

Ключевые слова: корова, молоко, жирные кислоты, племенная ценность, GWAS

Молоко коров является ценным источником незаменимых аминокислот и жиров в питании человека. Последние оказывают неоценимую роль в усвоении организмом витаминов, являются важным сырьем для производства различных продуктов переработки. Содержание жира в молоке коров наиболее всего из компонентов подвержено высокой изменчивости и зависит как от средовых условий (кормление, технология содержания и др.), так и генетических факторов (порода, предки, генотип). Соотношение жирных кислот (ЖК) в молоке по числу атомов углерода, а также длине цепи, степени ее насыщения различается индивидуально по особям и на популяционном уровне. В этой связи понимание механизмов синтеза ЖК в молоке коров для определения локусов количественных признаков (QTL) их детерминирующих является важной научной задачей. Таким образом, нами была поставлена цель изучить изменчивость содержания жирных кислот в молоке коров голштинизированной черно-пестрой и голштинской пород на примере ряда стад Подмосковья, а также выявить регионы в геноме молочного скота ассоциированные с жирнокислотным составом. Первичные данные по составу молока (10 вариантов ЖК) были получены с использованием инфракрасного анализатора MilkoScan 7 (FOSS) в период 2018 года и далее объединены с родословной животного с использованием баз данных ИАС «Селэкс». Ввиду наличия SNP-профилей средней плотности только для быков-производителей, информацию по продуктивности дочерей которых нам удалось собрать для GWAS, были использованы их оценки племенной ценности, рассчитанные по

методу BLUP с элиминацией средовых факторов (BLUPF90). Контроль качества генотипирования и анализ полногеномных ассоциаций выполняли с помощью программы Plink 1.9 для 220 производителей (39 тыс. SNP). Мы детектировали 32 (p<0.001) каузальные мутации ассоциированные с содержанием ЖК в молоке коров, наиболее значимые из которых были на хромосомах 1, 5, 6, 10, 11, 14, 19, 22 и 26. Гены CHST11, ACO2, PPARGC1A, NRXN1, LPIN1, ASIC2, PCDH15, PRKG1 были напрямую сопряжены с синтезом ряда ЖК (C14, C16, C18, индексом насыщенных и ненасыщенных ЖК, конъюгированной линолевой кислотой и др.). Наравне с этим был обнаружен ряд генов, входящих в QTL, которые были ассоциированы с показателями фертильности животных, линейными параметрами вымени и конечностей (NCAM2, FGD4, KCNIP4, SFXN1, NBAS, PGR, MON1B, GPLD1, PRKG1). Анализ источников международных баз данных показывает, что выявленные гены часто имеют плейотропное действие. Это еще раз подтверждает сложный характер наследуемости ЖК, и одновременно с этим возможность использования информации по содержанию ЖК в молоке для управления показателями здоровья и фертильности молочных коров. Дальнейшие GWAS-исследования будут дополнены прямыми (скорректированными) фенотипами коров для ЖК молока и дана сравнительная характеристика результатов выявленных SNP для разных выборок: оценки племенной ценности быков-отцов и собственной продуктивностью их дочерей. «Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №21-76-20046)».

UDC 637.12.05.055:636.2.034 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-352-354

GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY FOR COWS' MILK FATTY ACIDS DERIVED BY INFRARED SPECTRA

Sermyagin A.A., Gladyr E.A., Ignatieva L.P., Lashneva I.A., Kositsin A.A., Artemieva O.A., Ermilov A.N., Zinovieva N.A.

Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst
Podolsk, Russia,
Moscow region, Podolsk 142132, Dubrovitsy 60
e-mail: alex_sermyagin85@mail.ru

The first results of the genome-wide associations analysis for fatty acids composition in cow milk by Russian Holsteinized Black-and-White and Holstein breeds were obtained. Genomic regions (QTL) associated with milk fat percentage, fatty acids synthesis, functional parameters of linear type for udder and leg traits, fertility features have been detected.

Key words: cow, milk, fatty acids, breeding value, GWAS

Cow's milk is a valuable source of essential amino acids and fats in human nutrition. The last one plays an invaluable role in the digestion of vitamins for human diet and also, they are an important crude for producing different milk products. The fat content in cow's milk has the high variability compare to other compounds and depends on both environmental conditions (feeding, keeping technology, etc.) and genetic features (breed, ancestors, genotype). The of fatty acids (FA) differentiation in milk depends by number of carbon atoms, the length of a carbon chain, the degree of its saturation and vary individually for animals and under population level. In this regard, understanding the mechanisms of FA synthesis in cow's milk to determine the quantitative trait loci (QTL) is an important scientific goal. Thus, the aim was to study a variation of fatty acids components in milk for Holsteinized Black-and-White and Holstein cows in the Moscow region, as well as to identify regions in the dairy cattle genome associated with fatty acid composition. Initial data for milk composition (10 FA variants) were obtained using an infrared analyzer MilkoScan 7 (FOSS) for the year 2018 and then combined with the animals' pedigree using the IAS "Seleks" herd databases. Due to the middle densities SNP arrays for bulls that we had, the information for daughters' production traits was used, to calculate bulls estimated breeding values (EBV) by BLUP procedure with eliminating environmental factors (BLUPF90 software). The genotypes quality control and GWAS testing based on Plink 1.9 program for 220 sires (≈39 thousand SNPs) were carry out. We detected 32 causal mutations (the polymorphic nucleotides) that were significantly associated with milk fatty acid content (p<0.001) and have located by Bos taurus autosome on 1, 5, 6, 10, 11, 14, 19, 22 and 26 chromosomes. CHST11, ACO2, PPARGC1A, NRXN1, LPIN1, ASIC2, PCDH15, PRKG1 genes were directly linking with synthesis of different

FA types (C14, C16, C18, saturated and unsaturated FA indexes, conjugated linoleic acid, etc.). Along with this, a number of genes included in the QTL were found, which were associated with animal fertility traits, linear type of udder and legs features (NCAM2, FGD4, KCNIP4, SFXN1, NBAS, PGR, MON1B, GPLD1, PRKG1). Analysis of GWAS study results using international databases revealed that detected genes frequently have pleiotropic effect. There is once again confirms the complex nature of FA heritability and at the same time the possibility of using the FA content in milk to manage the health and fertility traits in dairy cows. The further GWAS studies will be addition by «pure» (adjusted) cow phenotypes for milk FA and a comparative characteristic of the results for identified SNPs in different datasets will be given: bulls EBVs and productions traits of their daughters. «The research was supported by Russian Science Foundation, project number 21-76-20046».

УДК 636.39.034:637.072 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-354-357

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ И КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МОЛОКА КАРАЧАЕВСКИХ И НУБИЙСКИХ КОЗ

Трухачев В.И., Селионова М.И., Айбазов А.М.М., Боголюбова Н.В., Зиновьева Н.А.

*Российский государственный аграрный университет -
Московская сельскохозяйственная академия им. К.А.Тимирязева, Москва, Россия,
127550, Москва, ул. Тимирязевская, 41,
e-mail: m_selin@mail.ru
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Московская область, Россия,
142132, г/о Подольск, п. Дубровицы, 60*

У карачаевских коз выявлены более интенсивные процессы белкового и углеводно-липидного обмена. С увеличением числа лактаций в крови нубийских коз повышался уровень белка, глюкозы и холестерина, карачаевских коз – мочевины и триглицеридов. Молоко обеих пород отличалось высоким содержанием жира, белка, казеина, при большем их количестве в молоке карачаевских коз.

Ключевые слова: карачаевские и нубийские козы, метаболизм, козье молоко, соматические клетки

Ценные свойства козьего молока – гипоаллергенность белкового состава, высокая переваримость и усвояемость жира за счет большого содержания короткоцепочечных жирных кислот, определяют возрастающий интерес к молочному козоводству во многих странах мира [1]. В странах Азии, Африки, Северной и Южной Америке производство молока коз за последние 10 лет увеличилось на 21,3%, 18,4% и 9,5% соответственно [2]. В России численность племенных молочных коз с 2010 года выросла более чем в 5 раз [3]. Наряду со специализированными молочными породами – зааненской, альпийской, тоггенбургской, широко используются и молочно-мясные – нубийская, ламанча. В Северо-Кавказском регионе регионах распространение получили местные козы мясо-шерстно-молочного направления – дагестанские, карачаевские.

Изучение в сравнительном аспекте метаболического профиля, качественных показателей молока коз разного направления из различных регионов разведения представляет научный интерес для накопления референтных данных, оценки состояния здоровья животных и поиска взаимосвязи между биохимическими показателями организма коз и получаемой от них продукции.

В результате проведенных исследований выявлено, что белковый обмен в организме карачаевских коз протекает более интенсивно по сравнению с нубийскими козами, что выражается в достоверном повышении в их крови уровня общего белка (на 4,96%, $p<0,01$), в т. ч. альбуминовой, глобулиновой фракций, мочевины (на 36,27%, $p<0,001$), а также активности ферментов переаминирования (на 21,0%, $p<0,001$). Кроме того, отмечены межпородные различия в углеводно-липидном обмене, проявившиеся в увеличении у карачаевских коз концентрации глюкозы (на 15,8%, $p<0,05$), тенденции к снижению уровня холестерина и фосфолипидов, повышению триглицеридов, что также указывает на более интенсивный энергетический обмен в их организме (табл. 1).

Таблица 1. – Показатели азотистого и углеводно-липидного обмена в крови лактирующих коз разных пород

Показатель	Нубийские козы (n=22)	Карачаевские козы (n=67)
Азотистый обмен		
Белок общий, г/л	82,38±0,99	86,47±0,96**
Альбумины, г/л	33,51±0,77	34,84±0,50
Глобулины, г/л	48,87±1,30	51,63±0,96
Альбумины / Глобулины	0,70±0,03	0,69±0,02
Мочевина, мМ/л	9,18±0,30	12,51±0,20***
Креатинин, мкМ/л	72,81±3,81	75,88±2,19
АЛТ, МЕ/л	18,52±0,99	24,27±1,196***
АСТ, МЕ/л	87,17±7,29	90,79±1,92
Углеводно-липидный обмен		
Глюкоза, мМ/л	2,58±0,12	2,83±0,04*
Триглицериды, мМ/л	0,23±0,003	0,24±0,004
Фосфолипиды, мМ/л	1,83±0,11	1,67±0,05
Триглицериды / Фосфолипиды	0,13±0,001	0,14±0,001
Билирубин общий, мкМ/л	7,52±0,44	13,98±0,52***
Холестерин, мМ/л	2,39±0,14	2,20±0,07

*Различия статистически достоверны при *- p<0,05, **- p<0,01, ***- p<0,001*

С увеличением числа лактаций, от I к III, у коз отмечено повышение концентрации метаболитов белкового и углеводно-липидного обмена: нубийской породы – общего белка, его фракций, глюкозы и холестерина соответственно на 5,3%, 5,6%, 18,7% и 13,1%; у карачаевских коз – уровня мочевины и триглицеридов на 3,9% и 1,1% соответственно.

Следует отметить высокие качественные показатели молока обеих пород, заключающиеся в высоком содержании жира, белка и казеина (табл. 2). В тоже время их уровень был выше в молоке карачаевских коз соответственно на 5,9%, 18,3% (p<0,001) и 16,6% (p<0,001). При этом отмечено меньшее количество соматических клеток на 23,3% (p<0,05) и их дифференциальное число – на 3,73%.

Таблица 2 – Качественные показатели молока нубийских и карачаевских коз II-III лактаций (весенний период)

Показатель	Нубийские козы (n=22)	Карачаевские козы (n=67)
Содержание жира, г/л	4,68±0,23	4,96±0,28
Содержание белка, г/л	4,04±0,11	4,78±0,09**
Уровень казеина, г/л	3,24±0,10	3,78±0,08**
Число соматических клеток, 10^3/см^3	876,87±74,52	672,73±58,13*
Дифференциальное количество соматических клеток, %	79,22±1,50	75,49±1,31

Лучшие показатели качественного состава молока карачаевских коз, по-видимому, связаны с пастбищным их содержанием, доступностью большего числа кормовых растений, с одной стороны, и технологией использования, предполагающей совместное содержание коз и потомства и ручное доение молока, с другой стороны. Тогда как система содержания нубийских коз предполагает отъем козлят сразу после рождения и доение доильными аппаратами.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РНФ в рамках проекта № 21-76-20008

Литература

1. *Getaneh G., Mebrat A., Wubie A., Kendie H. Review on goat milk composition and its nutritive value // J. Nutr. Health Sci. 2016. Vol. 3. № 4. P.1 -10.*
2. *Ерохин А.И., Карасев Е.А., Ерохин С.А. Динамика поголовья коз и производства козьего молока и мяса в мире и в России // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2020. – № 4. – С. 22-25.*
3. *Григорян Л.Н., Хататаев С.А., Новопашина С.И., Хмелевская Г.Н., Санников М.Ю., Степанова Н.Г. Молочное козоводство России и его племенная база // Зоотехния. – 2021. – № 1. – С. 11-14.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-354-357

METABOLIC PROFILE AND QUALITATIVE TRAITS OF MILK OF KARACHAEV AND NUBIAN GOATS

Trukhachev V.I., Selionova M.I., Aibazov A.M.M, Bogolyubova N. V., Zinovieva N.A.

Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia.
127550 Timiryazevskaya St., 41
e-mail: m_selin@mail.ru
Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Moscow Region, Russia, 142132 d/o Podolsk, p. Dubrovitsy, 60

More intensive processes of protein and carbohydrate-lipid metabolism were revealed in Karachaev goats. With an increase in the number of lactation in the blood of Nubian goats, the level of protein, glucose and cholesterol increased, and Karachaev goats – urea and triglycerides. The milk of both breeds was characterized by a high content of fat, protein, casein, with a greater amount of them in the milk of Karachaev goats.

Key words: Karachaev and Nubian goats, metabolism, goat's milk, somatic cells

The valuable properties of goat's milk – the hypoallergenic protein composition, high digestibility and digestibility of fat due to the high content of short-chain fatty acids, determine the growing interest in dairy goat breeding in many countries of the world (1). In the countries of Asia, Africa, North and South America, goat milk production has increased by 21.3%, 18.4% and 9.5%, respectively, over the past 10 years (2). In Russia, the number of breeding dairy goats has increased more than 5 times since 2010 (3). Along with specialized dairy breeds – Zaanen, Alpine, Toggenburg, dairy and meat breeds – Nubian, La Mancha are also widely used. In the North Caucasus region, local goats of the meat-wool-milk direction - Dagestan, Karachaev – have become widespread.

The study in the comparative aspect of the metabolic profile, qualitative indicators of milk of goats of different directions from different breeding regions is of scientific interest for the accumulation of reference data, assessment of the state of animal health and the search for the relationship between the biochemical parameters of the body of goats and the products obtained from them.

As a result of the conducted studies, it was revealed that protein metabolism in the body of Karachaev goats proceeds more intensively compared to Nubian goats, which is expressed in a significant increase in the level of total protein in their blood (4.96%, $p<0.01$), including albumin, globulin fractions, urea (36.27%, $p<0.001$), as well as the activity of transamination enzymes 21.0%, $p<0.001$). In addition, interbreed differences in carbohydrate-lipid metabolism were noted, manifested in an increase in glucose concentration in Karachaev goats (15.8%, $p<0.05$), a tendency to decrease the level of cholesterol and phospholipids, an increase in triglycerides, which also indicates a more intensive energy metabolism in their body (Table 1).

With an increase in the number of lactation, from I to III, goats showed an increase in the concentration of metabolites of protein and carbohydrate-lipid metabolism: Nubian breed-total protein, its fractions, glucose and cholesterol, respectively, by 5.3%, 5.6%, 18.7% and 13.1%; Karachaev goats – the level of urea and triglycerides by 3.9% and 1.1%, respectively.

It is worth noting the high quality indicators of milk of both breeds, consisting in a high content of fat, protein and casein (Table 2). At the same time, their level was higher in the milk of Karachaev goats by 5.9%, 18.3% ($p<0.001$) and 16.6% ($p<0.001$), respectively. At the same time, there was a smaller number of somatic cells by 23.3% ($p<0.05$) and their differential number by 3.73%.

Table 1. – Indicators of nitrogen and carbohydrate-lipid metabolism in the blood of lactating goats of different breeds

Traits	Nubian goats (n=42)	Karachaev goats (n=67)
Nitrogen metabolism		
Total protein, g/L	82,38±0,99	86,47±0,96**
Albumins, g/L	33,51±0,77	34,84±0,50
Globulins, g/L	48,87±1,30	51,63±0,96
Albumins/Globulins	0,70±0,03	0,69±0,02
Urea, mmol/L	9,18±0,30	12,51±0,20***
Creatinine, mmol/L	72,81±3,81	75,88±2,19
ALT, IU/L	18,52±0,99	24,27±1,196***
AST, IU/L	87,17±7,29	90,79±1,92
Carbohydrate-lipid metabolism		
Glucose, mmol/L	2,58±0,12	2,83±0,04*
Triglycerides, mmol/L	0,23±0,003	0,24±0,004
Phospholipids, mmol/L	1,83±0,11	1,67±0,05
Triglycerides/Phospholipids	0,13±0,001	0,14±0,001
Total bilirubin, µmol/L	7,52±0,44	13,98±0,52***
Cholesterol, mmol/L	2,39±0,14	2,20±0,07

*The differences are statistically significant when *- p<0.05, **- p<0.01, ***- p<0.001*

Table 2 – Qualitative traits of milk of Nubian and Karachaev goats of II-III lactation (spring period)

Traits	Nubian goats (n=42)	Karachaev goats (n=67)
Fat, g/l	4,68±0,23	4,96±0,28
Protein, g/l	4,04±0,11	4,78±0,09**
Casein, g/l	3,24±0,10	3,78±0,08**
Somatic cell count, $10^3/cm^3$	876,87±74,52	672,73±58,13*
Differential somatic cells count, %	79,22±1,50	75,49±1,31

The best indicators of the qualitative composition of the milk of Karachaev goats, apparently, are associated with their pasture content, the availability of a larger number of forage plants, on the one hand, and the technology of use, which involves the joint maintenance of goats and offspring and manual milking of milk, on the other hand. Whereas the system of keeping Nubian goats involves weaning the goats immediately after birth and milking with milking machines.

The research was funded by the Russian Science Foundation, Project No. 21-76-20008

References

1. *Getaneh G., Mebrat A., Wubie A., Kendie H. Review on goat milk composition and its nutritive value // J. Nutr. Health Sci. 2016. Vol. 3. № 4. P.1 -10.*
2. *Erokhin A.I., Karasev E.A., Erokhin S.A. Dynamics of goat population and goat milk and meat production in the world and in Russia // Sheep, goats, wool business. – 2020. – № 4. – P. 22-25.*
3. *Grigoryan L.N., Khatatayev S.A., Novopashina S.I., Khmelevskaya G.N., Sannikov M.Y., Stepanova N.G. Dairy goat breeding in Russia and its breeding base // Zootehnika. – 2021. – № 1. – P. 11-14.*

УДК 577.115:637.5.05 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-358-359

ОСОБЕННОСТИ АДИПОГЕНЕЗА БЕЛОЙ, БЕЖЕВОЙ И БУРОЙ ЖИРОВЫХ ТКАНЕЙ

Чернуха И.М., Котенкова Е.А.

ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им.В.М.Горбатова» РАН, г. Москва, Российская Федерация 109316 Москва, ул. Талалихина 26, imcher@inbox.ru

Белая и бурая жировая ткань присутствует в организме человека и хорошо описана. Как и влияние типа жира на здоровье человека, в частности, ожирение, диабет 2го типа, толерантность к инсулину. Присутствие и распределение различных типов жира у свиньи описано недостаточно. Как и факторы, способствующие «побурению» белого жира, и возможности влиять на это процесс у свиней.

Ключевые слова: жировая ткань, свиньи, белые, бежевые, бурые адипоциты, мясо

Свинина всегда была одним из самых популярных мясных продуктов в мире. За последние 20 лет (2000-2020 гг.) Производство свинины во всех категориях хозяйств Российской Федерации увеличилось в 2,5 раза. (https://agrovesti.net/lib/industries/beef-cattle/rossijskij-rynok-svininy-klyuchevye-tendentii-v-2020-2021-gg.html). В 2018 году была достигнута стопроцентная самообеспеченность России отечественной свининой. В то же время изменились потребительские предпочтения в отношении свинины. Многочисленные публикации о вреде холестерина и его высоком содержании в жирах привели к тому, что население начало массово отдавать предпочтение нежирной свинине. Значение жира и его участие в нормальном обмене веществ, поведении и даже здоровье долгое время недооценивались. Были изучены накопление жира, содержание жирных кислот, роль жира в качестве мяса и формировании аромата / вкуса. Кроме того, участие жира в укреплении здоровья претерпело значительные изменения за последнее десятилетие.

Тип жира, образующегося в организме, также имеет большое значение. Как известно, в организме животных и человека образуются три типа жиров (жировая ткань) - белый, коричневый и бежевый. Белый жир (WAT) является основным энергодепо и локализуется в основном под кожей и во внутренних органах. Основная функция коричневой (бурой) жировой ткани (BAT) - терморегуляция, осуществляемая в митохондриях с высоким содержанием разобщающего белка 1 (UCP1). Есть промежуточный тип жира – бежевый (BeAt) или коричневый (бурый) в белом (Brite). BAT развивается , начиная с эмбрионального периода, с 9,5–11,5 дней, в значительном количестве присутствует у млекопитающих в неонатальном периоде и исчезает в процессе роста. Считается, что клеточный процесс бежевого адипогенеза происходит в WAT и называется «потемнением/ побурением» WAT. Чрезмерное накопление белого жира провоцирует нарушение обмена веществ, в результате чего возникает ожирение, диабет 2 типа, гиперлипидемия и сердечно-сосудистые заболевания. Большинство исследований в этой области было сосредоточено на людях, их качестве жизни, борьбе с ожирением, диабетом II типа, метаболическим синдромом и т. д. Немногие исследования сосредоточены на сельскохозяйственных животных, в частности, на свиньях. Терморегуляция у поросят - одна из основных проблем. Особенно, если новорожденные поросята не имеют нормальной массы тела. У поросят сразу после рождения температура тела падает на 2-30С, а затем восстанавливается. Это решающий период в жизни поросенка. Смертность поросят от переохлаждения может достигать 50%. Большинство пород свиней не переносят холода, но некоторые из них, такие как тибетская свинья и минская свинья, признаны устойчивыми к холоду. UCP1 специфичен для жировой ткани человека, а UCP3 - для свиной. Однако нет систематической информации, содержащей данные о генетических корреляциях для основных пород свиней в Российской Федерации, показывающие масштабы взаимосвязи между образованием бежевых адипоцитов в различных условиях окружающей среды - температуре, содержании и кормлении. Основываясь на информации об адипогенезе у холодоустойчивых свиней, характеристики жира могут быть изменены и у других пород свиней, способствуя повышению устойчивости свиней к стрессу у свиней и нормализации термогенеза у новорожденных поросят.

(проект РНФ 21-76-20032)

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-358-359

ADIPOGENESIS FEATURES OF WHITE, BEIGE AND BROWN ADIPOSE TISSUES

I.Chernukha, E. Kotenkova

V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of RAS
109316 Talalikhina ul., 26, Moscow, Russian Federation,
imcher@inbox.ru

White and brown adipose tissue is present in the human body and is well described. As well as the effect of the type of fat on human health, in particular obesity, type 2 diabetes, insulin tolerance. The presence and distribution of different types of fat in pigs has not been adequately described. As well as the factors contributing to the "browning" of white fat and the ability to influence this process in pigs.

Key words: adipose tissue, pigs, white, beige, brown adipocytes, meat

Pork has always been one of the most popular meat products in the world. Over the past 20 years (2000-2020), the production of pork in all categories of RF production facilities has increased 2.5. (https://agrovesti.net/lib/industries/beef-cattle/rossijskij-rynok-svininy-klyuchevye-tendentsii-v-2020-2021-gg.html). In 2018, 100% Russian self-sufficiency with pork was achieved. At the same time, the consumer preferences for pork have changed. Numerous publications about the dangers of cholesterol and its high content in fat led to the fact that the population began to massively prefer lean pork. Fat significance and involvement in normal metabolism, behavior, and even health was underestimated for a long time. Fat accumulation, fatty acid content, the role of fat in meat quality and flavor/taste formation has been studied. As well as fat involvement in health promoting has undergone significant changes in the last decade.

The type of fat formed in the body is also of great importance. As is known, three types of fats (adipose tissues) are formed in the animal and human bodies – white, brown and beige. White fat (WAT) is the main energy depot and is localized mainly under the skin and viscerally. Brown adipose tissue (BAT)'s main function as thermoregulation, carried out in mitochondria with high content of uncoupling protein 1 (UCP1). There is intermediate type of fat beige (BeAt) or brown in white (Brite). BAT develops embryonically, starting at 9.5–11.5 days, presents in mammalians in the neonatal period in significant amount and disappears during growth. The cellular process of beige adipogenesis is thought to occur in WAT and is referred to as "browning" of WAT.

Excessive accumulation of white fat provokes metabolic disorders, resulting in obesity, type 2 diabetes, hyperlipidemia and cardiovascular diseases. Most of the research in this field was focused on humans, their quality of life, fight the obesity, diabetes type II, metabolic syndrome, etc. Not many researches are focused on farm animals, pigs in particular. Thermoregulation in piglets is one of the main problems. Especially if the newborn piglets haven't got the normal body weight. Body temperature drops 2-30C in piglets immediately after birth and then it recovers subsequently. This is the crucial period of a piglet's life. Piglet mortality during this period could be up to 50%. Mainly as a result of hypothermia. Most of the pig breeds are cold intolerant but some, such as the Tibetan pig and the Min pig are well recognized to be cold resistant. UCP1 is specific for human adipose tissue while UCP3 – for pig's.However, there is no systematic information containing data on the genetic correlations for all the main pig breeds in Russian Federation, showing the magnitude of the relationship between the formation of beige AT in different environmental conditions - climate, housing and feeding. Based on the information about beige adipogenesis in cold-tolerant pigs, fat characteristics may be altered in other pig breeds providing an alternative approach for fat redistribution in finishing pigs, increasing stress-tolerance in pigs and thermogenesis in newborn piglets.

(RSF project 21-76-20032)

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В СОЗДАНИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ С УЛУЧШЕННЫМИ ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫМИ ПРИЗНАКАМИ

MICROBIOLOGY APPROACH TO CROP DEVELOPMENT WITH ECONOMIC CHARACTERS IN PLANT GROWING

1. АНТИБИОТИК НЕМЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ ИМБРИЦИН – ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫЙ ПЕСТИЦИД ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ
Колодязная В.А., Бойкова И.В., Топкова О.В., Короткова О.И. 361

NON-MEDICAL ANTIBIOTIC IMBRICIN – ECOLOGICALLY SAFE PESTICIDE FOR PLANT PROTECTION
Kolodyaznaya V.A., Boykova I.V., Topkova O.V., Korotkova O.I. 362

2. ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ С РЕДАКТИРОВАННЫМ ГЕНОМОМ И ИЗМЕНЕННЫМ МЕТАБОЛИЗМОМ КРАХМАЛА
Нежданова А. В., Слугина М. А., Ефремов Г.И., Кочиева Е. З., Камионская А. М., Щенникова А. В. 363

GENERATION OF POTATO PLANTS WITH AN EDITED GENOME AND ALTERED STARCH METABOLISM
Nezhdanova A. V., Slugina M. A., Efremov G.I., Kochieva E. Z., Kamionskaya A. M., Shchennikova A. V. 364

3. АНТАГОНИСТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МОНОКУЛЬТУР МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ КОНСОРЦИУМА С ДРОЖЖАМИ НА ПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ И ГРИБЫ
Ржевская В.С., Семенова Е.Ф., Теплицкая Л.М., Зайцев Г.П., Цокало И.Е. Омельченко А.В., Бугара И.А. 365

ANTAGONISTIC EFFECT OF MONOCULTURES OF MILK-OXIDE BACTERIA AND THEIR CONSORTIUM WITH YEASTS ON PATHOGENIC BACTERIA AND FUNGI
Rzhevskaya V.S., Semenova E.F., Teplitskaya L.M., Zaitsev G.P., Tsokalo I.E. Omelchenko A.V., Bugara I.A. 367

4. ПОВЫШЕНИЕ ВСХОЖЕСТИ СЕМЯН ЛЮЦЕРНЫ НА ОСНОВЕ ПРИМЕНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ СКАРИФИКАЦИИ
Смирнова И.Э., Саданов А.К. 368

INCREASING THE GERMINATION OF ALFALFA SEEDS BASED ON THE USE OF BIOLOGICAL SCARIFICATION
Smirnova I.E., Sadanov A.K. 369

УДК 632.93 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-361-363

АНТИБИОТИК НЕМЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ ИМБРИЦИН – ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫЙ ПЕСТИЦИД ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Колодязная В.А.[1], **Бойкова И.В.**[2], **Топкова О.В.**[1], **Короткова О.И.**[1]

[1] *Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация*
[2] *Всероссийский институт защиты растений, 196608, Санкт-Петербург*
e-mail: vera.kolodyaznaya@pharminnotech.com

Изучена биологическая активность антибиотика немедицинского назначения имбрицина с целью определения возможности его использования в качестве экологически безопасного и эффективного биопрепарата для защиты растений от болезней и вредных членистоногих.

Ключевые слова: имбрицин, антибиотики немедицинского назначения, биопрепараты, защита растений, антагонистическая активность, инсектицидная активность, экологическая безопасность.

Резкий скачок интенсивности загрязнения окружающей среды и снижение качества сельскохозяйственной продукции в результате применения химических пестицидов оказало сильное влияние на практическое внедрение биологических методов защиты растений во всех странах мира [1]. Биопрепараты являются важнейшим элементом современных технологий фитосанитарной оптимизации агроценозов [2]. Ожидается, что рынок биопрепаратов достигнет 8,5 млрд. долларов к 2025 году [3]. Для защиты растений используют антибиотики немедицинского назначения (АНН) с целью распространения резистентных форм микроорганизмов.

Объектом исследования являлся АНН имбрицин, полученный и выделенный на кафедре биотехнологии Санкт-Петербургского Химико-Фармацевтического Университета (СПХФУ). Имбрицин является неполиеновым макролидным противогрибковым АНН. Благодаря своей низкой токсичности и высокой фунгицидной активности имбрицин нашел применение в пищевой промышленности, а также в изготовлении биостойкой бумаги, используется в сельском хозяйстве для защиты хлопчатника от заболеваний [4]. Перспективы применения имбрицина расширяются, в том числе и в сельском хозяйстве.

Антагонистическую активность АНН имбрицина определяли стандартным микробиологическим методом лунок по диаметру зоны лизиса тест-культуры. В качестве тест-культур использовали фитопатогенные грибы: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Alternaria solani* Sorauer, *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc., *Fusarium graminearum* Schwabe, *Fusarium oxysporum* Schltdl., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.; и бактерии: Clavibacter michiganensis subsp.michiganensis (Smith) *Davis et al* (штамм 101), *Pseudomonas syringae pv. maculicola* (McCulloch) Young *et al.*, *Pseudomonas syringae pv. tomato* (van Hall) Young et al. Выбор данных фитопатогенов обусловлен широкой распространенностью и опасностью вызываемых ими заболеваний растений. Определение инсектицидной активности образцов антибиотиков немедицинского назначения проводили в лабораторных условиях на виковой тле (*Megoura viciae* Buckt.) при контактном способе обработки. Виковая тля относится к группе сосущих членистоногих вредителей, которая крайне распространена и приносит большой ущерб сельскохозяйственным культурам.

На основании полученных данных установлено, что исследованный образец АНН имбрицин проявил высокую антагонистическую активность против всех изученных фитопатогенных грибов, а также против фитопатогенных бактерий. Было определено, что *Pseudomonas syringae pv. maculicola* и *Pseudomonas syringae pv. tomato* нечувствительны к данному образцу антибиотика. Имбрицин активно подавлял рост грибов рода *Alternaria spp. Alternaria spp.* является возбудителем ряда опасных заболеваний различных сельско-хозяйственных культур, включая зерновые, масличные культуры, такие овощные культуры, как цветная капуста, брокколи, морковь и картофель, томат, а также некоторые плодовые культуры

Исходя из полученных результатов показано, что имбрицин имеет высокую антагонистическую активность в отношении грибов рода *Fusarium spp.*, которые являются значимыми фитопатогенными грибами, широко распространенными и вызывающими огромные экономические потери во всем мире в сельском хозяйстве вследствие заражения растений и в животноводстве. Опасность заражения сельскохозяйственных культур возбудителями фузариоза обусловлена их способностью продуцировать микотоксины. [5].

Выявлено, что имбрицин активен против *Pseudomonas syringae pv. maculicola*. Данный фитопатоген широко распространен и вызывает бактериальную пятнистость крестоцветных.

Полученные результаты позволяют рассматривать имбрицин как перспективный биологически безопасный биопрепарат для защиты растений от фитопатогенов и вредителей.

Литература

1. *Асатурова АМ, Жевнова НА, Цыгичко АА, Аллахвердян ВВ, Хомяк АИ, Бондарчук ЕЮ, Саенко КЮ, Астахов ММ, Гырнец ЕА, Штерншис МВ. Влияние лабораторных образцов биопрепаратов и их смесей с органоминеральными удобрениями на рост и развитие растений озимой пшеницы и подсолнечника. Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2019; 20(6): 602-612. DOI: 10.30766/2072-9081.2019.20.6.602-612*
2. *Краснобаева ИЛ, Коваленко НМ, Попова ЭВ. Влияние хитина на биологическую активность штаммов Bacillus subtilis. Вестник защиты растений, 2020; 4 (103): 233-240 DOI: 10.31993/2308-6459-2020-103-4-13272*
3. *Khakimov AA, Omonlikov AU, Utaganov SBU Current status and prospects of the use of biofungicides against plant diseases. GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, 2020: 13(03): 119-126. DOI: 10.30574/gscbps.2020.13.3.0403*
4. *Belakhov VV, Yakovleva EP, Kolodyaznaya VA et al. Imbricin, an Antifungal Antibiotic of Non-Medical Application: Preparation, Physicochemical Properties, Structural Features, and Industrial and Agricultural Uses (Review). Russ J Gen Chem, 2017; 87: 3220–3232 DOI: 10.1134/S1070363217130175*
5. *Hof H. The Medical Relevance of Fusarium spp. Journal of Fungi. 2020; 6(3): 117. DOI: 10.3390/jof6030117*

UDC 632.93 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-361-363

NON-MEDICAL ANTIBIOTIC IMBRICIN – ECOLOGICALLY SAFE PESTICIDE FOR PLANT PROTECTION

Kolodyaznaya V.A.[1], **Boykova I.V.**[2], **Topkova O.V.**[1], **Korotkova O.I.**[1]

[1] *Saint Petersburg State University of Chemistry and Pharmacy, 197376, St. Petersburg, st. prof. Popova, 14, Russian Federation*
[2] *All-Russian Institute of Plant Protection, 196608, St. Petersburg*
e-mail: vera.kolodyaznaya@pharminnotech.com

The biological activity of the non-medical antibiotic imbricin was studied in order to determine the possibility of its use as an ecologically safe and effective biological product for protecting plants from diseases and harmful arthropods.

Key words: imbricin, non-medical antibiotics, biological products, plant protection, antagonistic activity, insecticidal activity, environmental safety.

A sharp jump in the intensity of environmental pollution and a decrease in the quality of agricultural products as a result of the use of chemical pesticides had a strong impact on the practical implementation of biological methods of plant protection in all countries of the world [1]. Biological products are the most important element of modern technologies for phytosanitary optimization of agrocenoses [2]. The biologics market is expected to reach $ 8.5 billion by 2025 [3]. Non-medical antibiotics are used for plant protection in order to spread resistant forms of microorganisms.

The object of the study was the ANN imbricin, obtained and isolated at the Department of Biotechnology of the St. Petersburg Chemical-Pharmaceutical University (SPKhFU). Imbricin is a non-polyene macrolide antifungal ANN. Due to its low toxicity and high fungicidal activity, imbricin has found application in the food industry, as well as in the manufacture of biostable paper, and it is used in agriculture to protect cotton from diseases [4]. The prospects for the use of imbritsin are expanding, including in agriculture.

The antagonistic activity of ANN imbricin was determined by the standard microbiological method of the wells by the diameter of the lysis zone of the test culture. Phytopathogenic fungi were used as test cultures: Alternaria alternata (Fr.) Keissl., Alternaria solani Sorauer, Fusarium culmorum (W.G.Sm.) Sacc., Fusarium graminearum Schwabe, Fusarium oxysporum Schltdl., Fusarium solani (Mart.) Sacc .; and bacteria: Clavibacter michiganensis subsp.michiganensis (Smith) Davis et al (strain 101), Pseudomonas syringae pv. maculicola (McCulloch) Young et al., Pseudomonas syringae pv. tomato (van Hall) Young et al. The choice of these phytopathogens is due to the widespread prevalence and danger of plant diseases caused by them. Determination of insecticidal activity of non-medical antibiotic samples was carried out in laboratory conditions on vetch aphid (Megoura viciae Buckt.) with a

contact method of treatment. The vetch aphid belongs to the group of sucking arthropod pests, which is extremely common and causes great damage to agricultural crops.

Based on the data obtained, it was established that the studied sample of ANN imbricin showed high antagonistic activity against all studied phytopathogenic fungi, as well as against phytopathogenic bacteria. It was determined that P*seudomonas syringae pv. maculicola* and *Pseudomonas syringae pv. tomato* are insensitive to this antibiotic sample. Imbricin actively suppressed the growth of fungi of the genus *Alternaria spp. Alternaria spp*. is the causative agent of a number of dangerous diseases of various agricultural crops, including cereals, oilseeds, vegetables such as cauliflower, broccoli, carrots and potatoes, tomatoes, as well as some fruit crops.

Based on the results obtained, it was shown that imbricin has a high antagonistic activity against fungi of the genus *Fusarium spp.*, which are significant phytopathogenic fungi, widespread and causing huge economic losses in agriculture throughout the world due to infection of plants and animal husbandry. The danger of contamination of crops with *Fusarium* pathogens is due to their ability to produce mycotoxins. [5].

It was revealed that imbricin is active against *Pseudomonas syringae pv. maculicola*. This phytopathogen is widespread and causes bacterial spotting in cruciferous plants.

The results obtained make it possible to consider imbricin as a promising biologically safe biological product for protecting plants from phytopathogens and pests.

References

1. *Asaturova AM, Zhevnova NA, Tsygichko AA, Allakhverdyan VV, Khomyak AI, Bondarchuk YEYU, Sayenko KYU, Astakhov MM, Gyrnets YEA, Shternshis MV. Vliyaniye laboratornykh obraztsov biopreparatov i ikh smesey s organomineral'nymi udobreniyami na rost i razvitiye rasteniy ozimoy pshenitsy i podsolnechnika. Agrarnaya nauka Yevro-Severo-Vostoka. 2019; 20(6): 602-612. DOI: 10.30766/2072-9081.2019.20.6.602-612*
2. *Krasnobayeva IL, Kovalenko NM, Popova EV. Vliyaniye khitina na biologicheskuyu aktivnost' shtammov Bacillus subtilis. Vestnik zashchity rasteniy, 2020; 4 (103): 233-240 DOI: 10.31993/2308-6459-2020-103-4-13272*
3. *Khakimov AA, Omonlikov AU, Utaganov SBU Current status and prospects of the use of biofungicides against plant diseases. GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, 2020: 13(03): 119-126. DOI: 10.30574/gscbps.2020.13.3.0403*
4. *Belakhov VV, Yakovleva EP, Kolodyaznaya VA et al. Imbricin, an Antifungal Antibiotic of Non-Medical Application: Preparation, Physicochemical Properties, Structural Features, and Industrial and Agricultural Uses (Review). Russ J Gen Chem*
5. *Hof H. The Medical Relevance of Fusarium spp. Journal of Fungi. 2020; 6(3): 117. DOI: 10.3390/jof6030117*

УДК 604.6; 601.4; 602.6 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-363-365

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ С РЕДАКТИРОВАННЫМ ГЕНОМОМ И ИЗМЕНЕННЫМ МЕТАБОЛИЗМОМ КРАХМАЛА

Нежданова А. В., Слугина М. А., Ефремов Г.И., Кочиева Е. З., Камионская А. М., Щенникова А.В.

Институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
117312, Москва, пр-т 60-летия Октября, д. 7, корп. 1
e-mail: anna-negdanova@mail.ru

Получены растения картофеля с редактированным геномом. Отредактированные линии характеризуются нарушениями гравитропизма корней, развития надземной части и метаболизма крахмала.

Ключевые слова: геномное редактирование; CRISPR/Cas9; *Solanum tuberosum*; крахмалфосфорилаза PHO1a; метаболизм крахмала.

Направленное редактирование генома с помощью системы CRISPR/Cas9 является современной технологией получения растений с измененными признаками [1]. Крахмалфосфорилаза *PHO1a* – один из ключевых ферментов метаболизма крахмала [2]. Целью настоящего исследования стал функциональный анализ гена *PHO1a* путем получения растений картофеля с его нокаутом. С помощью программ CRISPRdirect [3] и CRISPR MultiTargeter [4] была проанализирована последовательность гена *PHO1a* картофеля и определен консервативный участок, пригодный в качестве гидовой РНК [5]. Конструкцией с гид-РНК была

проведена агробактериальная трансформация стеблевых эксплантов картофеля (сорта Red Scarlett, Мишка, Люкс, Жуковский и Терра) с последующей селекцией регенерантов на среде, содержащей канамицин (50 мг/л). В результате было получено 233 регенеранта, давших положительный ПЦР-сигнал на присутствие кассеты gRNA в геноме. В сравнении с нетрансгенными образцами сортов 82 регенеранта характеризовались нарушениями гравитропизма корней и развития надземной части. Гравитропизм обеспечивается амилопластами корней высших растений (статолитами) – плотными органеллами, оседающими в нижней части клетки, что способствует гравитационному росту корней [6]. В амилопластах происходит синтез и хранение крахмальных гранул. С одной стороны крахмалфосфорилаза определяет фосфоролиз крахмала [2]. С другой – принимает участие в наработке затравки (полисахарида, состоящего из 3-4 остатков глюкозы, соединенных гликозидными связями) для дальнейшего биосинтеза крахмала [2]. Фенотип полученных регенерантов предполагает нарушение работы фермента PHO1a в результате нокаута гена *PHO1a* и, как следствие, изменения в метаболизме крахмала в амилопластах корней за счет усиления деградации или синтеза крахмальных зерен, что и привело к смене гравитационной ориентации амилопластов и корней. Секвенирование участка редактирования у регенерантов с фенотипом обнаружило несинонимичную замену G1→T1 (координаты в редактируемом участке). Обнаруженная замена приводит к радикальному замещению G261V в белковой последовательности домена GT35_Glycogen_Phosphorylase domain, которое способно повлиять на структуру, укладку, активность фермента и/или его способность взаимодействовать с партнерами и субстратом. Предположительно, другие варианты редактирования летально изменяли ген крахмалфосфорилазы, из-за чего регенеранты становились нежизнеспособными. Биохимический анализ корней редактированных растений выявил значительные отличия в содержании крахмала в сравнении с контролем. Данное исследование поддержано РФФИ (грант № 18-29-07007) и Министерством науки и высшего образования РФ.

Статьи из журналов и сборников

1. *Arora L., Narula A. Gene editing and crop improvement using CRISPRCas9 system//Front Plant Sci. 2017. Vol. 8. Article 1932.*
2. *Slugina MA, et al. The expression pattern of the Pho1a genes encoding plastidic starch phosphorylase correlates with the degradation of starch during fruit ripening in green-fruited and red-fruited tomato species. Funct Plant Biol. 2019;46(12):1146-1157.*
3. *Naito Y., Hino K., Bono H., Ui-Tei K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites//Bioinformatics. 2015. Vol. 31. № 7. P. 1120–1123.*
4. *Prykhozhij S. V., Rajan V., Gaston D., Berman J. N. CRISPR multitargeter: a web tool to find common and unique CRISPR single guide RNA targets in a set of similar sequences//PLoS One. 2015. Vol. 10. № 3. Article e0119372.*
5. *Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Wang B., Yang Z., Li H., Lin Y., Xie Y., Shen R., Chen S., Wang Z., Chen Y., Guo J., Chen L., Zhao X., Dong Z., Liu Y. G. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants//Mol. Plant. 2015. Vol. 8. № 8. P. 1274–1284.*
6. *Zhang Y, et al. Auxin-mediated statolith production for root gravitropism. New Phytol. 2019;224(2):761-774.*

UDK 604.6; 601.4; 602.6 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-363-365

GENERATION OF POTATO PLANTS WITH AN EDITED GENOME AND ALTERED STARCH METABOLISM

Nezhdanova A.V., Slugina M.A., Efremov G.I., Kochieva E.Z., Kamionskaya A.M., Shchennikova A.V.

Institute of Bioengineering, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
117312, Moscow, pr-t 60-letiya Oktyabrya, 7, korp. 1
e-mail: anna-negdanova@mail.ru

Potato plants with the edited genome were obtained. Edited lines are characterized by changes in root gravitropism, aboveground part development and starch metabolism.

Key words: genome editing; CRISPR/Cas9; Solanum tuberosum; starch phosphorylase PHO1a; starch metabolism.

Direct genome editing using the CRISPR/Cas9 system is the modern technology for obtaining plants with altered traits [1]. Starch phosphorylase *PHO1a* is one of the key enzymes of starch metabolism [2]. This study was focused on the functional analysis of the *PHO1a* gene by obtaining potato plants with *PHO1a* knockout. Using the CRISPRdirect [3] and CRISPR MultiTargeter [4], the potato *PHO1a* sequence was analyzed and a conserved region suitable as a guide RNA was determined [5]. Agrobacterial transformation of potato stem explants (cv. Red Scarlett, Mishka, Lux, Zhukovsky, and Terra) was carried out using a construct with a guide RNA, followed by selection of regenerants on a medium containing kanamycin (50 mg/l). As a result, 233 regenerants with positive PCR signal for the presence of a gRNA cassette in the genome were obtained. In comparison with non-transgenic cultivar accessions, 82 regenerants were characterized by changed root gravitropism and aerial part development. In higher plants, root gravitropism is determined by amyloplasts (statoliths) – dense organelles that settle in the lower part of the cell, which contributes to the gravitational growth of roots [6]. In amyloplasts, starch granules are synthesized and stored. On the one hand, starch phosphorylase determines the phosphorolysis of starch [2]. On the other hand, it takes part in the production of a precursor (a polysaccharide consisting of 3-4 glucose residues connected by glycosidic bonds) for further starch biosynthesis [2]. The phenotype of the obtained regenerants suggests disruption of the *PHO1a* enzyme function as a result of *PHO1a* gene knockout, and, as a consequence, changes in starch metabolism in root amyloplasts due to increased degradation or synthesis of starch grains, which led to a change in the gravitational orientation of amyloplasts and roots. Sequencing of the edited sequence in regenerants with the phenotype revealed a nonsynonymous substitution G1→T1 (coordinates in the edited site). The detected substitution leads to a radical substitution G261V in the protein GT35_Glycogen_Phosphorylase domain, which can affect the structure, folding, and activity of the enzyme, as well as its ability to interact with protein partners and the substrate. Presumably, other possible editing events lethally alter the starch phosphorylase gene, making the regenerants unviable. Biochemical analysis of the roots of the edited plants revealed significant differences in the starch content in comparison with the control. The study was supported by the RFBR #18-29-07007 and Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

References

1. *Arora L., Narula A. Gene editing and crop improvement using CRISPRCas9 system//Front Plant Sci. 2017. Vol. 8. Article 1932.*
2. *Slugina MA, et al. The expression pattern of the Pho1a genes encoding plastidic starch phosphorylase correlates with the degradation of starch during fruit ripening in green-fruited and red-fruited tomato species. Funct Plant Biol. 2019;46(12):1146-1157.*
3. *Naito Y., Hino K., Bono H., Ui-Tei K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites//Bioinformatics. 2015. Vol. 31. № 7. P. 1120–1123.*
4. *Prykhozhij S. V., Rajan V., Gaston D., Berman J. N. CRISPR multitargeter: a web tool to find common and unique CRISPR single guide RNA targets in a set of similar sequences//PLoS One. 2015. Vol. 10. № 3. Article e0119372.*
5. *Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Wang B., Yang Z., Li H., Lin Y., Xie Y., Shen R., Chen S., Wang Z., Chen Y., Guo J., Chen L., Zhao X., Dong Z., Liu Y. G. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants//Mol. Plant. 2015. Vol. 8. № 8. P. 1274–1284.*
6. *Zhang Y, et al. Auxin-mediated statolith production for root gravitropism. New Phytol. 2019;224(2):761-774.*

УДК (579.61+579.64):(579.862.1+579.864.1+582.282.232) DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-365-367

АНТАГОНИСТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МОНОКУЛЬТУР МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ КОНСОРЦИУМА С ДРОЖЖАМИ НА ПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ И ГРИБЫ

Ржевская В.С., Семенова Е.Ф., Теплицкая Л.М., Зайцев Г.П., Цокало И.Е. Омельченко А.В., Бугара И.А.

Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия
295007, г. Симферополь, проспект Вернадского, 4,
e-mail: viktoriyar45@mail.ru

Показана эффективность консорциума молочнокислых бактерий и дрожжей подавлять фитопатогенные бактерии и микромицеты, условно-патогенные бактерии в условиях in vitro. Выявлено, что 1,0% раствор

культуральной жидкости микробного консорциума оказывает максимальный эффект на снижение инфицированности семян злаков.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии; консорциум микроорганизмов; антагонистическая активность; фитопатогены, патогенные для человека бактерии.

В современных условиях актуальна разработка консорциумов микроорганизмов, подавляющих условно-патогенные для человека и фитопатогенные бактерии и микроскопические грибы. Целью нашего исследования является изучение антагонистической активности монокультур молочнокислых бактерий и их консорциума с дрожжами по отношению к фитопатогенам, а также санитарно-показательным и патогенным для человека бактериям в условиях *in vitro*.

В состав разработанного консорциума были включены молочнокислые бактерии: *Lactobacillus casei* IMB B-7343, *Lactobacillus plantarum* IMB B-7344, *Lactococcus lactis* IMB B-7352 и дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-5046.

Как показали результаты наших исследований, антагонистическая активность монокультур трех штаммов молочнокислых бактерий меньше, чем активность их микробной ассоциации. Так, по отношению к *E. coli* штамм *L. plantarum* IMB B-7344 имел зону задержки роста, равную 30,0 ± 0,6 мм, штамм *L. casei* IMB B-7343 – 28,3 ± 0,7 мм, штамм *L. lactis* IMB B-7352 – 32,5 ± 0,9 мм, при этом ассоциация указанных микроорганизмов - 35,0 ± 0,8 мм. Следовательно, антагонистическая активность монокультур молочнокислых бактерий выражена меньше, чем консорциума, состоящего из этих микроорганизмов. Такая закономерность отмечена по отношению к следующим микроорганизмам: *Xanthomonas campestris, Agrobacterium tumefaciens, Phytophthora cactorum, Salmonella typhimurium, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*.

По отношению к микромицетам монокультуры молочнокислых бактерий и их ассоциация с дрожжами обладают, как фунгицидной, так и фунгистатической активностью. Антагонистическая активность консорциума микроорганизмов по отношению к плесневым грибам рода *Aspergillus* была незначительная, зона задержки роста микромицетов составляла менее 20 мм. По отношению к фитопатогенным грибам родов *Fusarium, Alternaria, Stachybotrys* микробный консорциум обладал высокой фунгицидной активностью - зона задержки роста составила от 18,0±1,0 до 28,0±1,5 мм.

Известно, что большинство болезнетворных микроорганизмов растений переносится с помощью семенного материала. В связи с этим, было проведено изучение влияния предпосевной обработки семян микробным консорциумом на инфицирование пшеницы, результаты которого представлены в таблице.

Варианты опыта на различных питательных средах	Контроль	Раствор культуральной жидкости		
		0,1%	0,5%	1,0%
Сорт Смуглянка				
среда Чапека	16,7±0,4	11,9±0,3	3,1±0,1	2,9±0,07
картофельный агар	21,6±0,7	18,7±0,4	0	0
картофельно-глюкозный агар	16,8±0,5	10,7±0,3	6,2±0,2	3,1±0,08
Сорт Подолянка				
среда Чапека	71,8±0,5	67,1±1,8	48,4±1,2	34,4±0,9
картофельный агар	75,4±2,8	69,1±2,1	57,2±1,7	33,3±0,7
картофельно-глюкозный агар	78,0±3,0	68,9±1,9	65,0±1,5	42,6±0,9

При обработке семян пшеницы 1,0%-ным раствором ассоциативной культуры, наблюдался максимальный эффект снижение интенсивности поражения семян грибной инфекцией.

Способность подавлять условно-патогенные и фитопатогенные микроорганизмы объясняется обнаруженными нами в культуральной жидкости микробного консорциума метаболитами, обладающими бактерицидным и фунгицидным свойствами: сквален, диметилфумарат, каприновая кислота, молочная кислота, уксусная кислота, каприловая кислота, фумаровая кислота, масляная кислота, дециловый спирт, бутанол, пентанол, β-фенилэтиловый спирт.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-365-367

ANTAGONISTIC EFFECT OF MONOCULTURES OF MILK-OXIDE BACTERIA AND THEIR CONSORTIUM WITH YEASTS ON PATHOGENIC BACTERIA AND FUNGI

Rzhevskaya V.S., Semenova E.F., Teplitskaya L.M., Zaitsev G.P., Tsokalo I.E. Omelchenko A.V., Bugara I.A.

Crimean Federal University M. V.I. Vernadsky, Russia
295007, Simferopol, Vernadsky Avenue, 4, e-mail: viktoriyar45@mail.ru

The efficiency of the consortium of lactic oxide bacteria and yeast is shown to suppress phytophotogenic bacteria and micromicets, conditionally pathogenic bacteria in vitro conditions. It has been shown that 1.0% of the solution of the culture fluid of the microbial consortium has the maximum effect in reducing the infestation of seed cereals.

Keywords: Lactic oxide bacteria; Consortium of microorganisms; Antagonistic activity; Phytopatogens, pathogenic to humans.

The development of consortia of microorganisms that inhibit opportunistic and phytopatogenic bacteria and microscopic fungi is of current relevance. The aim of our research is to study the antagonistic activity of the monocultures of lactic-oxide bacteria and their consortium with yeast in relation to phytopathogens, as well as health indicator and pathogenic bacteria in vitro.

Milk-oxide bacteria were included in the consortium. *Lactobacillus casei* IMB-7343, *Lactobacillus plantarum* IMB-7344, *Lactososos lactis* IMB-7352, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* IMB Y-5046.

As our research has shown, the antagonistic activity of the monocultures of the three strains of lactic oxide bacteria is less than the activity of their microbial association. For example, in relation to *E. coli*, the strain *L. plantarum* IMB B-7344 had a growth delay zone of 30.0 0.6 mm, a strain of *L. casei* IMB B-7343 - 28.3 0.7 mm, a strain of *L. lactis* IMB B-7352 - 32.5 0.9 mm, while the association of the said micro-organisms - 35.0.8 mm. Consequently, the antagonistic activity of the monocultures of lactic-oxide bacteria is less than that of the consortium consisting of these microorganisms. This pattern is noted for the following micro-organisms: *Xanthomonas campestris, Agrobacterium tumefaciens, Phytophthora cactorum, Salmonella typhimurium, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*.

In relation to micromycetes, the monoculture of lactic-oxide bacteria and their association with yeast have both fungicidal and fungistatic activity. The antagonistic activity of the consortium of microorganisms in relation to mold fungi of the genus *Aspergillus* was insignificant, with a growth retardation zone of less than 20 mm. For the *Fusarium, Alternaria* and *Stachybotrys* genera, the microbial consortium had high fungicidal activity, with growth retardation ranging from 18.0 1.0 to 28.0 1.5 mm.

It is known that most plant pathogens are carried by seed material. In this connection, the impact of pre-plant seed treatment by a microbial consortium on wheat infection was studied and the results are presented in the table.

Experiences in different nutrient media	Monitoring	Fluid solution		
		0,1%	0,5%	1,0%
Variety Smuglyanka				
Habitat Czapek	16,7±0,4	11,9±0,3	3,1±0,1	2,9±0,07
Ppotato agar	21,6±0,7	18,7±0,4	0	0
Glucose potato agar	16,8±0,5	10,7±0,3	6,2±0,2	3,1±0,08
Variety Podolyanka				
Habitat Czapek	71,8±0,5	67,1±1,8	48,4±1,2	34,4±0,9
Ppotato agar	75,4±2,8	69,1±2,1	57,2±1,7	33,3±0,7
Glucose potato agar	78,0±3,0	68,9±1,9	65,0±1,5	42,6±0,9

In the treatment of wheat seeds with 1.0% associative culture solution, maximum effect was observed in reducing the intensity of seed infestation with fungal infection.

The ability to suppress opportunistic and phytophagenic microorganisms is explained by the metabolites found in the culture fluid of the microbial consortium which have bactericidal and fungicidal properties: squalene, dimethylfumarate, caprine acid, lactic acid, acetic acid, caprillic acid, fumaric acid, oily acid, decile alcohol, butanol, pentanol, β-phenyl alcohol.

УДК 579.64 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-368-369

ПОВЫШЕНИЕ ВСХОЖЕСТИ СЕМЯН ЛЮЦЕРНЫ НА ОСНОВЕ ПРИМЕНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ СКАРИФИКАЦИИ

Смирнова И.Э., Саданов А.К.

ТОО «Научно-производственный центр микробиологи и вирусологии», Алматы, Казахстан
050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, д. 105
e-mail: iesmirnova@mail.ru

Разработан способ повышения всхожести семян люцерны на основе применения целлюлолитических бактерий (биологическая скарификация). Показана, что предпосевная обработка семян бактериями повышает всхожесть семян и урожайность зеленой массы люцерны.

Ключевые слова: целлюлолитические бактерии; целлюлазы; люцерна; твердокаменность семян; всхожесть; биологическая скарификация

Одним из основных источников производства кормов является люцерна (*Medicago sativa* L.), которая характеризуется многоукосностью и стабильным урожаем. Трава люцерны богата протеином, содержит каротин, кальций, витамины и другие питательные элементы [1]. Однако часто при посеве люцерны ¼ засеянных полей остается пустыми, так как всходят не все семена, что приводит к сильной разреженности посевов. Это связано с наличием твердокаменных семян, содержание которых доходит до 40–60% [2]. Низкая всхожесть таких семян обусловлена биологической особенностью - они имеют очень плотную и твердую оболочку, эти семена не набухают и не прорастают. Для повышения всхожести семян применяют механическую скарификацию, которая разрушает твердую оболочку [3]. Однако механическая скарификация часто вызывает повреждение зародыша семян, что приводит к его поражению фитопатогенами, загниванию проростков и гибели растений.

Целью исследования является разработка принципиально нового биологического способа повышения всхожести семян люцерны, основанного на применение целлюлолитических бактерий, способных синтезировать ферменты целлюлазы, которые частично нарушают целостность твердой оболочки семян, и, тем самым, повышают их всхожесть.

Для повышения всхожести семян люцерны был выделен и отселекционирован штамм аэробных целлюлолитических бактерий 21N2. Идентификация штамма молекулярно-генетическими методами установила, что штамм относится к *Bacillus sp.* Изучение состава целлюлазного комплекса штамма бактерий показало, что в состав входят три фермента: 1.4-β-эндоглюканаза; β-глюкозидаза и целлобиогидролаза. Исследование микроструктуры оболочки семян люцерны на электронном микроскопе (JEOL-3000, Japan), обработанных бактериями, выявило, что под действием ферментов целлюлаз происходит деструкция клеточных стенок оболочки и в ней образуются микротрещины. Можно сказать, что целлюлазы бактерий частично разрушают твердую оболочку семян (биологическая скарификация), при этом оболочка становится более мягкой для прорастания. Также, через образующиеся микротрещины ускоряется доступ воды и растворенных в ней минеральных и питательных веществ к зародышу семян, что является дополнительным стимулирующим фактором.

Полевые испытания штамма *Bacillus sp.* 21N2 показали, что обработка семян бактериями повышала всхожесть семян до 75-78% (контроль 59%). При этом высота растений увеличилась в 1,6 раза, сырой вес одного растения - в 2,2 раза, а урожайность зеленой массы - на 10-12 т/га по сравнению с контролем. Полученные результаты полевых опытов свидетельствуют о высокой эффективности биологической скарификации семян.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан (грант № AP08855656).

Литература

1. *Волгин В.И., Романенко Л.В., Прохоренко П.Н., Федорова З.Л., Корочкина Е.А. Полноценное кормление молочного скота – основа реализации генетического потенциала продуктивности. – М.: РАН, 2018. – 260 с.*
2. *Boe A., Kephart K.D., Berdahl J.D., Peel M.D., Brummer E.C., Xu L., Wu Y. Breeding alfalfa for semiarid regions in the Northern Great Plains: History and additional genetic evaluations of novel germplasm // Agronomy. 2020. Vol. 10(11). P. 1686.*
3. *Jones C.D., Stevens M.R., Jolley Von D., Hopkins B.G., Jensen S.L., Turner D., Stettler J.M. Evaluation of thermal, chemical, and mechanical seed scarification methods for 4 Great Basin lupine species // Native Plants Journal. 2016. Vol. 17(1). P. 5-17.*

UDC 579.64 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-368-369

INCREASING THE GERMINATION OF ALFALFA SEEDS BASED ON THE USE OF BIOLOGICAL SCARIFICATION

Smirnova I.E., Sadanov A.K.

LLC "Research and Production Center for Microbiology and Virology", Almaty, Kazakhstan
050010, Almaty, st. Bogenbai batyr, 105
e-mail: iesmirnova@mail.ru

A method has been developed to increase the germination of alfalfa seeds based on the use of cellulolytic bacteria (biological scarification). It is shown that inoculation of seeds with bacteria increases the germination and productivity of the green mass of alfalfa.

Key words: cellulolytic bacteria; cellulases; alfalfa; hard seeds; germination; biological scarification

One of the main sources of feed production is alfalfa (*Medicago sativa* L.), which is characterized by a large harvest and a stable yield. Alfalfa is rich in protein, carotene, calcium, vitamins and other nutrients [1]. However, often when sowing alfalfa, ¼ of the sown fields remains empty, since not all seeds sprout, which leads to a strong sparseness of crops. This is due to the presence of hard seeds, the content of which reaches 40–60% [2]. The low germination of hard seeds is due to a biological property - they have a very dense and hard coat, these seeds do not swell or germinate. To increase germination, mechanical scarification is used, which destroys the hard coat [3]. However, mechanical scarification often causes damage to the embryo of seeds, which leads to its damage by phytopathogens, rotting of seedlings and death of plants.

The purpose of this study is to develop a fundamentally new biological method for increasing the germination of alfalfa seeds, based on the use of cellulolytic bacteria capable of synthesizing cellulase enzymes, which partially degrade the integrity of the hard coat of seeds, and thereby increase their germination.

To increase the germination of alfalfa seeds, a strain of aerobic cellulolytic bacteria 21N2 was isolated and selected. The identification of the strain by molecular genetic methods established that the strain belongs to *Bacillus sp.* The study of the composition of the cellulase complex of bacteria showed that the composition includes three enzymes: 1.4-β-endoglucanase; β-glucosidase and cellobiohydrolase. The microstructure of the seed coat inoculated with cellulolytic bacteria was studied using an electron microscope (JEOL-3000, Japan). It was shown that under the effect of cellulase enzymes, the cell walls of the coat are degraded and microcracks are formed. We can say that under the influence of cellulases, a partial destruction of the hard coat of seeds (biological scarification) occurs, while the coat becomes softer for germination. Also, through the formed microcracks, the access of water and mineral and nutrients dissolved in it to the embryo of seeds is accelerated, which is an additional stimulating factor.

Field tested of the strain Bacillus sp. 21N2 was showed: seeds inoculation with cellulolytic bacteria increased germination up to 75-78% (control 59%). At the same time, the height of the plants increased 1.6 times, the wet weight of one plant - 2.2 times, and the productivity of green mass - by 10-12 t / ha compared with control. The obtained results of field experiments indicate the high efficiency of the biological scarification of seeds.

This research was funded by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (Grant No AP08855656.).

References

1. *Volgin V.I., Romanenko L.V., Prokhorenko P.N., Fedorova Z.L., Korochkina E.A. Adequate feeding of dairy cattle is the basis for realizing the genetic potential of productivity. M.: RAS, 2018. 260 p. in Russ.*
2. *Boe A., Kephart K.D., Berdahl J.D., Peel M.D., Brummer E.C., Xu L., Wu Y. Breeding alfalfa for semiarid regions in the Northern Great Plains: History and additional genetic evaluations of novel germplasm // Agronomy. 2020. Vol. 10(11). P. 1686.*
3. *Jones C.D., Stevens M.R., Jolley Von D., Hopkins B.G., Jensen S.L., Turner D., Stettler J.M. Evaluation of thermal, chemical, and mechanical seed scarification methods for 4 Great Basin lupine species // Native Plants Journal. 2016. Vol. 17(1). P. 5-17.*

О ПОДГОТОВКЕ ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ КАДРОВ, В ТОМ ЧИСЛЕ, ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

TRAINING OF HIGHLY QUALIFIED SPECIALISTS IN BIOTECHNOLOGY AND GENE ENGINEERING

1. ВСЕРОССИЙСКАЯ МОЛОДЕЖНАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ «ЭКОТОКСИКОЛОГИЯ» – КЛЮЧЕВОЙ ЭЛЕМЕНТ ДЛЯ ПРИВЛЕЧЕНИЯ СТУДЕНТОВ К РЕШЕНИЮ ИННОВАЦИОННЫХ ЗАДАЧ БИОТЕХНОЛОГИИ ЗАЩИТЫ И ВОССТАНОВЛЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ
Понаморева О.Н., Алферов В.А., Осина К.В., Боронин А.М. 371

RUSSIAN SCHOOL-CONFERENCE "ECOTOXICOLOGY" - A KEY ELEMENT FOR ATTRACTING STUDENTS TO SOLVE INNOVATIVE TASKS OF ENVIRONMENTAL PROTECTION BIOTECHNOLOGY
Ponamoreva O.N., Alferov V.A., Osina K.V., Boronin A.M. 372

2. РАЗВИТИЕ НАВЫКОВ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ МАГИСТРАНТОВ, ОБУЧАЮЩИХСЯ ПО НАПРАВЛЕНИЮ ПОДГОТОВКИ БИОТЕХНОЛОГИЯ
М.Г. Сульман, Г.Н. Демиденко 373

THE IMPORTANCE OF THE DISCIPLINES OF BLOCK 1 FOR THE DEVELOPMENT OF RESEARCH SKILLS OF UNDERGRADUATES STUDYING IN THE DIRECTION OF BIOTECHNOLOGY
M.G. Sulman, G.N. Demidenko 374

УДК 378+504.6 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-371-373

ВСЕРОССИЙСКАЯ МОЛОДЕЖНАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ «ЭКОТОКСИКОЛОГИЯ» – КЛЮЧЕВОЙ ЭЛЕМЕНТ ДЛЯ ПРИВЛЕЧЕНИЯ СТУДЕНТОВ К РЕШЕНИЮ ИННОВАЦИОННЫХ ЗАДАЧ БИОТЕХНОЛОГИИ ЗАЩИТЫ И ВОССТАНОВЛЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Понаморева О.Н.[1], **Алферов В.А.**[1], **Осина К.В.**[1], **Боронин А.М.**[2]

[1] *ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет».*
300012, Тула, проспект Ленина, 92.
e-mail: olgaponamoreva@mail.ru
[2] *Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН - обособленное структурное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН.*
142290, Московская область, г.Пущино, Проспект Науки, д. 5

Одной из важнейших форм привлечения талантливой молодежи к решению инновационных задач являются научные школы-конференции. Всероссийская молодежная школа-конференция «Экотоксикология» ежегодно проводится в ТулГУ с 2006 года и играет важную роль в подготовке биотехнологов в области защиты окружающей среды.

Ключевые слова: высшее образование, биотехнология, молодежная научная школа-конференция, экотоксикология

В современном мире глобальные проблемы, связанные с сокращением природных ресурсов, динамикой изменения состояния окружающей среды, диктуют необходимость перехода к биоэкономики как новому экономическому мироустройству. Движущей силой новой экономики являются биотехнологии, в том числе биотехнологии защиты и восстановления окружающей среды, поэтому биотехнологическая подготовка студентов является приоритетным направлением высшего образования в Российской Федерации. Привлечение талантливой молодежи к участию в перспективных научных исследованиях и решению инновационных задач по приоритетным направлениям развития науки, технологий и техники является необходимым условием повышения уровня высшего образования. Одной из важнейших форм академической мобильности, приобретения научного опыта и формирования новых научных контактов среди молодых ученых являются молодежные научные школы-конференции.

В рамках функционирования научно-образовательного центра «Экобиотехнология» (НОЦ), созданного в 2005 году в Тульском государственном университете (ТулГУ) при участии Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (ИБФМ РАН), для студентов и молодых ученых ежегодно проводится российская научная школа-конференция «Экотоксикология». Основным тематическим направлением конференции является обсуждение вопросов биотехнологии защиты окружающей среды. Однако, учитывая, что биотехнология, в целом, определяет пути и методы изменения окружающей человека природной среды в соответствии с его потребностями и основана на последних достижениях генетической инженерии, физикохимии ферментов, молекулярной диагностике, селекционной генетике, микробиологии и др., молодым ученым предоставляется возможность представить научные результаты по различным направлениям биотехнологии, что расширяет профессиональный кругозор участником конференции и способствует формированию междисциплинарного мышления биотехнологов. Программа конференции включает пленарные доклады ведущих ученых по тематике конференции и работу секций в виде устных докладов остальных участников. В работе конференции ежегодно участвуют около 70 студентов и молодых ученых из различных регионов и стран ближнего зарубежья. Среди участников проводится конкурс на лучшую научную работу. Важным фактором, который способствует повышению уровня научных докладов, является постоянное участие в работе конференции ведущих ученых (пленарные доклады и жюри конкурса) Пущинского научного центра по биологии РАН, Объединенного центра ядерных исследований РАН, Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН и др., и молодых ученых (устные доклады) из научных центров и университетов России. Конференция аккредитована по программе У.М.Н.И.К. За все время работы конференции 23 молодых ученых из ТулГУ, Пущинского научного центра по биологии РАН, ВятГУ, БелГУ были признаны победителями и получили грантовое финансирование Фонда содействия инновациям. С первых курсов студенты ТулГУ: биотехнологи, химики и биологи, слушают научные доклады,

участвуют в обсуждениях и сами выступают на конференции. По отзывам тех, из них, кто выбрал научную деятельность после окончания университета, и продолжил обучение в магистратуре и аспирантуре в ТулГУ, других университетах и научных центрах, участие в работе школы-конференции «Экотоксикология» с первого года обучения, стало определяющим при выборе их дальнейшего жизненного пути. Таким образом, участие студентов-биотехнологов в работе молодежной школы-конференции «Экотоксикология» является важным элементом их подготовки к научно-исследовательской деятельности, без которой невозможно решать инновационные задачи в области биотехнологии защиты окружающей среды.

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-371-373

RUSSIAN SCHOOL-CONFERENCE "ECOTOXICOLOGY" - A KEY ELEMENT FOR ATTRACTING STUDENTS TO SOLVE INNOVATIVE TASKS OF ENVIRONMENTAL PROTECTION BIOTECHNOLOGY

Ponamoreva O.N.[1], **Alferov V.A.**[1], **Osina K.V. 1, Boronin A.M.**[2]

[1] *Tula State University*
300012, Lenina Ave., 92, Tula, Russia.
e-mail: olgaponamoreva@mail.ru
[2] *Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS – A Separate Subdivision of Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research RAS" (IBPM RAS)*
142290, Nauki Ave., 5, Pushchino, Moscow Oblast, Russia

The leading forms of recruiting the gifted youth to solution of innovative tasks are scientific workshops and conferences. The Russian Young Scientist School-Conference "Ecotoxicology" has been held in Tula State University since 2006, and it plays an important role in training biotechnologists in environmental field of research.

Keywords: higher education, biotechnology, young scientist conference, ecotoxicology

The global challenges of modern world related to scarcity of natural resources and dynamics of changing environment dictate the requirement for switching to bioeconomy as a new economical world order. The driver of the new economy is biotechnology, including biotechnology of protection and recultivation of environment. That is why biotechnological training of the students is one of top priority directions of higher education in Russian Federation. Recruitment of talented youth to participation in promising research and solution of innovative tasks in priority directions of development of science, technology and industry is a mandatory condition for improvement of the quality of higher education. One of the most important forms of academic mobility, acquisition of scientific experience and formation of new contact network in science among young scientists is participation in young scientist conferences. Inside the framework of functioning of scientific and educational center "Ecobiotechnology" created in Tula State University in 2005 with participation of the Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS (IBPM RAS), Russian School-Conference "Ecotoxicology" for students and young scientists is held annually. The main theme of the conference is discussion of environmental biotechnology. However, taking into account that biotechnology on the whole determines the methods and ways to change the human's natural environment according to his needs, and that it is based on the recent achievements of genetic engineering, physical chemistry of enzymes, molecular diagnostics, genetics of selection, microbiology, etc., the young scientists are given an opportunity to present their scientific results in different areas of biotechnology, which broadens the professional horizon of the participants and facilitates formation of interdisciplinary thinking of biotechnologists. The programme of the Conference includes plenary talks of leading scientists in the field of the Conference and talks of other participants in the sections. About 70 students and young scientists from different regions and neighboring countries participate in the Conference each year. A contest for the best scientific work is held among the participants. A significant factor of elevating the quality of the scientific talks is permanent participation of the leading scientists (plenary talks and jury of the contest) from Pushchino Scientific Center, Joint Institute for Nuclear Research, Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, and young scientists (section talks) from scientific centers and universities of Russia. The Conference has the accreditation of UMNIK program. During the whole period of the existence of the Conference, 23 young scientists from Tula State University, Pushchino Scientific Center for Biological Research RAS, Vyatka State University, Belgorod State University were announced as the UMNIK winners and received grant support of the Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises.

From the first year in the universities, the students of Tula State University, namely biotechnologists, chemists and biologists, listen to the talks, participate in discussions and make section talks themselves. Those of them who chose scientific field after graduating from the university and continued their education in master programs and postgraduate programs in Tula State University and other universities and scientific centers reported that participation in the Ecotoxicology School Conference from the very first years of education was a factor determining their choice of further career. Thus, participation of biotechnology students in the Ecotoxicology School-Conference is an important element of their tuition for the scientific career, which is essential for solution of innovative tasks in environmental biotechnology.

УДК 378.14 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-373-374

РАЗВИТИЕ НАВЫКОВ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ МАГИСТРАНТОВ, ОБУЧАЮЩИХСЯ ПО НАПРАВЛЕНИЮ ПОДГОТОВКИ БИОТЕХНОЛОГИЯ

М.Г. Сульман, Г.Н. Демиденко

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия
170026, Россия, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22
e-mail: sulman@online.tver.ru

Развитие навыков исследовательской деятельности у магистрантов является одним из значимых элементов образовательного процесса, позволяющим сформировать заложенные федеральными государственными образовательными стандартами высшего образования компетенции и подготовить высококвалифицированные научно-исследовательские кадры.

Ключевые слова: высшее образование, биотехнология, магистратура, научно-исследовательская деятельность.

К задачам профессиональной деятельности студентов, осваивающих программу магистратуры по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология, относятся подбор, обработка и анализ научно-технической и патентной информации по тематике исследования; анализ показателей технологического процесса на соответствие научным разработкам; разработка программ научных исследований, оценка и анализ полученных результатов; поиск и разработка новых эффективных путей получения биотехнологических продуктов; создание современных биотехнологий; подготовка отчетной документации, аналитических обзоров и справок, документации для участия в конкурсах научных проектов, публикация научных результатов, защита интеллектуальной собственности и др.
В процессе обучения поставленные задачи раскрываются в различных формах обучения, отраженных в структуре программы магистратуры: дисциплинах базовой и вариативной части, практиках (в том числе, научно-исследовательской работе) и государственной итоговой аттестации.
Одним из вариантов развития навыков исследовательской деятельности является закрепление вузом в учебном плане ряда специальных дисциплин, направленных на развитие и закрепление общепрофессиональных и профессиональных компетенций.

UDC 378.14 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-373-374

THE IMPORTANCE OF THE DISCIPLINES OF BLOCK 1 FOR THE DEVELOPMENT OF RESEARCH SKILLS OF UNDERGRADUATES STUDYING IN THE DIRECTION OF BIOTECHNOLOGY

M.G. Sulman, G.N. Demidenko

Tver State Technical University, Tver, Russia
A. Nikitin str. 22, 170026, Tver, Russia
e-mail: sulman@online.tver.ru

The development of research skills among undergraduates is one of the significant elements of the educational process, which allows forming the competencies laid down by the federal state educational standards of higher education and preparing highly qualified research personnel.

Key words: higher education, biotechnology, master's degree program, research activities.

The tasks of professional activity of students mastering the master's program in the field of training 19.04.01 Biotechnology include the selection, processing and analysis of scientific, technical and patent information on the subject of research; analysis of technological process indicators for compliance with scientific developments; development of research programs, evaluation and analysis of the results obtained; search and development of new effective ways to obtain biotechnological products; creation of modern biotechnologies; preparation of accounting documentation, analytical reviews and references, documentation for participation in competitions of scientific projects, publication of scientific results, protection of intellectual property, etc.

In the course of training, the tasks set are revealed in various forms of training, reflected in the structure of the master's program: the disciplines of the basic and variable part, practices (including research work) and the state final certification.

One of the options for developing research skills is to consolidate a number of special disciplines in the curriculum of the university aimed at developing and consolidating general professional and professional competencies.

ОБЩИЙ РАЗДЕЛ

OTHERS

1. ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК VITEX AGNUS-CASTUS
В КАЧЕСТВЕ ПРОДУЦЕНТА ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОЛУЧЕНИЯ ФИТОЭКДИСТЕРОИДОВ
Володина Е.В., Володина С.О., Топкова О.В. 376

OBTAINING CALLUS CULTURE OF VITEX AGNUS-CASTUS CELLS
AS A PRODUCER FOR BIOTECHNOLOGICAL OBTAINING OF PHYTOEXDYSTEROIDS
Volodina E.V., Volodina S.O., Topkova O.V. 377

2. КВАНТОВАЯ БИОЭКОНОМИКА И ЭКОМОНИТОРИНГ НЕФТЕГАЗОВЫХ МЕСТОРОЖДЕНИЙ
НА ПРИМЕРЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ НА СУПЕРКОМПЬЮТЕРНОМ СТЕГАНОГРАФИЧЕСКОМ
ПРОГРАММНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ КОМПЛЕКСЕ С СИСТЕМОЙ РАСПРЕДЕЛЕННЫХ РЕЕСТРОВ
Раткин Л.С. 378

QUANTUM BIOECONOMICS AND ECOMONITORING OF OIL AND GAS FIELDS ON THE EXAMPLE
OF SIMULATION OF PROCESSES ON THE SUPERCOMPUTER STEGANOGRAPHIC SOFTWARE
AND TECHNOLOGICAL COMPLEXES WITH THE SYSTEM OF DISTRIBUTED REGISTERS
L. Rathkeen 379

3. АНТИМИКРОБОЕ ДЕЙСТВИЕ ВИДОВ МЯТЫ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В СОЧИНСКОМ ПРИЧЕРНОМОРЬЕ
Рыбалко А.А., Рыбалко А.Е., Агумава А.А. 380

ANTIMICROBIAL EFFECT OF SPECIES OF MINT GROWING IN THE SOCHI BLACK SEA REGION
Rybalko A.A., Rybalko A.E., Agumava A.A. 382

4. МАГНИТНЫЕ НАНОКОМПОЗИТЫ
В ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ДАТЧИКАХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛИФОСАТА
Фарафонова О.В., Смольянинова Д.М., Бизина Е.В., Ларина М.Ю., Ермолаева Т.Н. 383

MAGNETIC NANOCOMPOSITES
IN PIEZOELECTRIC SENSORS FOR DETERMINATION OF GLYPHOSATE
Farafonova O.V., Smolyaninova D.M., Bizina E.V., Larina M.Yu., Ermolaeva T.N. 384

УДК 576.533+633.8+577.13+ 604.4 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-376-377

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК VITEX AGNUS-CASTUS В КАЧЕСТВЕ ПРОДУЦЕНТА ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОЛУЧЕНИЯ ФИТОЭКДИСТЕРОИДОВ

Володина Е.В.[1], **Володина С.О.**[2], **Топкова О.В.**[1]

[1] *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения РФ 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А*
[2] *Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук 167982, Сыктывкар, ГСП-2, ул. Коммунистическая, 28*
e-mail: lvolod28@gmail.com

Работа посвящена изучению процессов каллусогенеза *Vitex agnus-castus* в условиях *in vitro*. Показана способность каллусной культуры клеток к биосинтезу экдистероидов.

Ключевые слова: *Vitex agnus-castus*, каллусная культура клеток, фитоэкдистероиды

В настоящее время особую остроту приобретает проблема профессионального долголетия и улучшения качества жизни людей. В этом отношении показана большая перспектива использования в восстановительной медицине, гериатрии и спорте адаптогенов, относящихся к классу фитоэкдистероидов и представляющих собой полигидроксилированные стерины, структурно подобные или идентичные гормонам линьки насекомых [1]. Ранее было показано, что экдистероиды более характерны растениям южных флор. Например, высокое содержание экдистероидов было обнаружено в древесных растениях рода *Vitex L.* (Lamiaceae), распространенных, главным образом, в субтропиках, тропиках и реже в умеренном поясе [2]. На территории бывшего СССР описан единственный вид этого рода – витекс священный (*Vitex agnus-castus L.*), который встречается на Черноморском побережье Кавказа, в Закавказье, Крыму и Средней Азии. Занесен в Красную книгу. Плоды и листья включены в Европейскую фармакопею. Деревья этого вида интродуцированы и могут выращиваться в южных регионах России [3]. Биотехнологии, основанные на культурах клеток *in vitro*, имеют ряд преимуществ по сравнению с традиционным культивированием лекарственного сырья.

Нами были обнаружены места произрастания и собраны семена витекса священного в горной части Адлеровского района г. Сочи на Черноморском побережье Кавказа. Получена быстрорастущая каллусная культура клеток *Vitex agnus- castus*. Изучено влияние гормонального состава питательной среды и типа эксплантa на процессы каллусогенеза в культуре *in vitro*. Показано, что максимальная частота индукции быстрорастущего каллуса наблюдалась при использовании среды Мурасиге и Скуга с добавлением 2,4Д (1,5 мг/мл) и БАП (0,2 мг/мл). Более интенсивное каллусообразование наблюдалось при использовании в качестве эксплантa сегментов листа. Показана способность клеточной культуры к биосинтезу экдистероидов.

Исследования выполнены по теме НИР Гр № АААА-А17-117121270025-1.

Литература

1. *Фитоэкдистероиды / Под ред. В.В. Володина. – СПб.: Наука, 2003. – 293 с.*
2. *Володин В. В. Экдистероидсодержащие растения национального парка Кук Фыонг (Северный Вьетнам) / В. В. Володин, Л. Ву Тхи, С. О. Володина, А. Н. Кузнецов // Известия Коми НЦ УрО РАН. – 2018. – Т. 3, № 35. – С. 46–53.*
3. *Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, и их химический состав, использование; Семейства Hippuridaceae–Lobrliaceae / Под ред. П.Д. Соколова. – СПб.: Наука, 1991. – С. 9.*

DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-376-377

OBTAINING CALLUS CULTURE OF VITEX AGNUS-CASTUS CELLS AS A PRODUCER FOR BIOTECHNOLOGICAL OBTAINING OF PHYTOEXDYSTEROIDS

Volodina E.V.[1], **Volodina S.O.**[2], **Topkova O.V.**[1]

[1] *FSEI of HE "Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University" Russian Federation Ministry of Health 197376, St. Petersburg, street Prof. Popov, building 14, let. A*
[2] *Institute of Biology, Komi Scientific Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences 167982, Syktyvkar, Kommunisticheskaya street, 28*
e-mail: lvolod28@gmail.com

The work is devoted to the study of the processes of callusogenesis of *Vitex agnus-castus in vitro*. The ability of callus cell culture to biosynthesis of ecdysteroids is shown.

Key words: *Vitex agnus-castus*, callus cell culture, phytoecdysteroids

Currently, the problem of professional longevity and improvement of the quality of life of people is becoming especially acute. In this regard, there is a great prospect of using adaptogens belonging to the class of phytoecdysteroids and representing polyhydroxylated sterols, structurally similar or identical to the hormones of insects, in restorative medicine, geriatrics and sports [1]. Earlier it was shown that ecdysteroids are more characteristic of plants of southern floras. For example, a high content of ecdysteroids was found in woody plants of the genus *Vitex L.* (Lamiaceae), distributed mainly in the subtropics, the tropics and less often in the temperate zone [2]. On the territory of the former USSR, the only species of this genus is described – the Vitex Sacred (*Vitex agnus-castus L.*), which is found on the Black Sea coast of the Caucasus, Transcaucasia, the Crimea and Central Asia. Fruits and leaves are included in the European Pharmacopoeia. Trees of this species are introduced and can be grown in the southern regions of Russia [3]. Biotechnologies based on cell culture in vitro have several advantages compared with the traditional cultivation of medicinal raw materials.

We have found growing places and collected seeds of Vitex sacred in the mountainous part of the Adler district of the city of Sochi on the Black Sea coast of the Caucasus. A fast-growing callus cell culture of *Vitex agnus-castus* was obtained. The influence of the hormonal composition of the nutrient medium and the type of explant on the processes of callusogenesis in culture *in vitro* was studied. It was shown that the maximum frequency of induction of fast-growing callus was observed when using Murashige and Skoog medium with the addition of 2.4 D (1.5 mg / ml) and BAP (0.2 mg / ml). More intensive callus formation was observed when using leaf segments as an explant. The ability of cell culture to biosynthesis of ecdysteroids is shown.

Studies have been carried out on the topic of research work. Gr. № AAAA-A17-117121270025-1.

References

1. Phytoecdysteroids / Edited by V.V. Volodin. – SPb.: Science, 2003. – p. 293

2. Volodin V.V. Ecdysteroid-containing plants of the Cuc Phuong National Park (North Vietnam) / V.V. Volodin, L. Vu Thi, S.O. Volodina, A.N. Kuznetsov // Komi Science Center Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. – 2018. – Vol. 3, № 35. – p. 46–53.

3. Plant resources of the USSR: Flowering plants, and their chemical composition, use; Families Hippuridaceae – Lobrliaceae / Ed. Pd Sokolova. – SPb.: Science, 1991. – p. 9.

УДК 621.039.75 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-378-380

КВАНТОВАЯ БИОЭКОНОМИКА И ЭКОМОНИТОРИНГ НЕФТЕГАЗОВЫХ МЕСТОРОЖДЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ НА СУПЕРКОМПЬЮТЕРНОМ СТЕГАНОГРАФИЧЕСКОМ ПРОГРАММНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ КОМПЛЕКСЕ С СИСТЕМОЙ РАСПРЕДЕЛЕННЫХ РЕЕСТРОВ

Раткин Л.С.

ФГУ ФНЦ «Научно-исследовательский институт системных исследований Российской академии наук», Москва, Россия
117218, Москва, Нахимовский проспект, 36, к.1
E-mail: Rathkeen@bk.ru

Представлены разработки в сфере квантовой биоэкономики и экологического мониторинга нефтегазовых месторождений. В качестве примера рассматривается моделирование процессов на суперкомпьютерном стеганографическом программно-технологическом комплексе с системой распределенных реестров.

Ключевые слова: биоэкономика, экологический мониторинг, нефтегазовые месторождения, моделирование, суперкомпьютеры, квантовые компьютеры, компьютерная стеганография, программно-технологический комплекс, система распределенных реестров.

Применение суперкомпьютеров и квантовых компьютеров в различных отраслях промышленного производства сформировало новое научное направление – «квантономика», посвященное изучению и направлениям развития квантовой экономики [1]. Для моделирования процессов освоения нефтегазового месторождения и экологического мониторинга разработан суперкомпьютерный стеганографический программно-технологический комплекс с системой распределенных реестров, позволяющий выявлять поисковые объекты на шельфе и в транзитных зонах методами аэрокосмического зондирования, сравнить результаты лабораторных и полевых исследований пластовых систем [2].

Разработанная методика позволяет проводить разведку нефтегазовых объектов с применением суперкомпьютеров и квантовых компьютеров на основе комплексирования геофизических данных, сопоставления результатов геофизических и геолого-технологических исследований, проводить многомерное цифровое геолого-геофизическое моделирование нефтегазоносных областей и кластеров нефтегазодобычи с использованием данным пилотируемых комплексов и беспилотных роботизированных систем [3]. В суперкомпьютерный стеганографический программно-технический комплекс интегрированы блоки оценки степени достоверности исходных данных и построения баз знаний (например, об оптимальных методах эксплуатации нефтегазовых месторождений в различных условиях, методах ремонта и реконструкции нефтегазопромысловых объектов на действующих месторождениях, технологиях оценки падающей добычи и степени применимости промыслового оборудования на месторождениях с аномальными термобарическими параметрами) [4].

Разработанный суперкомпьютерный стеганографический программно-технический комплекс с системой распределенных реестров позволяет сокращать потери при добыче нефти и газа, минимизировать затраты на добычу при высоких требованиях по экологической безопасности эксплуатации месторождений, проводить экологический мониторинг нефтегазовых месторождений, распределено хранить (за счет системы распределенных реестров) и оперативно передавать по высокоскоростным закрытым каналам связи (благодаря методам компьютерной стеганографии) данные для обработки локальными квантовыми вычислительными системами [5]. Полученная информация используется для прогнозов освоения нефтегазовых месторождений, создания карт «зон нефтегазодобычи с низким углеродных следом», формирования экологически благоприятных условий освоения нефтегазовых месторождений, предотвращения загрязнений окружающей среды, проведения биоэкономических расчетов с применением суперкомпьютеров и квантово-компьютерных систем [6]. Технология защищена патентом на изобретение в РФ и за рубежом [7].

Литература

1. *Раткин Л.С. К 90-летию со дня рождения первого директора ФТИАН академика Камиля Ахметовича Валиева: квантономика, квантово-технологическая инициатива и квантовая промышленность на примере повышения уровня диверсификации финансово-коммуникационных корпораций в военной и гражданских сферах // Инве-*

стиции в России. 2020. № 11 (310). С.35-38.

2. Burkhardt T., Stepanova D., Rathkeen L.S., Ismailov I., Lavrushin O., Sokolinskaya N., Danish M.S.S., Senjyu T., Yuksel S., Dinçer H. Introduction of biofuels as a way of solving ecological problems // International Journal of Energy Economics and Policy. 2021. V. 11. № 2. Pp. 187-193.

3. Раткин Л.С. Проблемы применения в ТЭК беспилотных многоцелевых комплексов // Технологии топливно-энергетического комплекса. 2007. № 2. С.10-11.

4. Раткин Л.С. Автоматизированная информационная система космического экологического мониторинга разработок нефтегазовых месторождений с применением компьютерной стеганографии // В книге: НАУЧНАЯ СЕССИЯ НИЯУ МИФИ-2015. Аннотации докладов: в 3-х томах. Отв. ред. О.Н. Голотюк. 2015. С. 91а.

5. Раткин Л.С. Квантовая стеганография и квантовые суперкомпьютеры и их применение для минимизации рисков производства продукции: «Новая экономика» наноиндустрии // В книге: VIII ежегодная конференция Нанотехнологического общества России. Сборник тезисов. Научное издание. Ответственный редактор Д.С.Андреюк. 2017. С.228-231.

6. Раткин Л.С. Разработка информационной системы для дистанционного обучения специалистов в сфере суперкомпьютерных и квантово-компьютерных вычислений с применением криптографии и компьютерной стеганографии на платформе «1С:Предприятие». // В сборнике: Новые информационные технологии в образовании. Сборник научных трудов XXI Международной научно-практической конференции. Под общей редакцией Д.В. Чистова. Москва, 2021. С. 474-476.

7. Раткин Л.С. Патент на изобретение РФ № 2322693.

UDK 621.039.75 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-378-380

QUANTUM BIOECONOMICS AND ECOMONITORING OF OIL AND GAS FIELDS ON THE EXAMPLE OF SIMULATION OF PROCESSES ON THE SUPERCOMPUTER STEGANOGRAPHIC SOFTWARE AND TECHNOLOGICAL COMPLEXES WITH THE SYSTEM OF DISTRIBUTED REGISTERS

L. Rathkeen

FSE FSC «Scientific Research Institute for System Researching of Russian Academy of Sciences », Moscow, Russia 117218, Moscow, Nachimovsky prospect, 36, b.1
E-mail: Rathkeen@bk.ru

The developments in the field of quantum bioeconomics and environmental monitoring of oil and gas fields are presented. As an example, the modeling of processes on the supercomputer steganographic software and technological complex with the system of distributed registers is considered.

Key words: bioeconomy, ecological monitoring, oil and gas fields, simulation, supercomputers, quantum computers, computer steganography, software and technological complex, system of distributed registers.

The use of supercomputers and quantum computers in various branches of industrial production has formed a new scientific direction – «quantum economics», devoted to the study and directions of development of the quantum economy [1]. To simulate the processes of oil and gas field development and environmental monitoring, a supercomputer steganographic software and technological complex with the system of distributed registers has been developed, which makes it possible to identify search objects on the shelf and in transit zones using aerospace sounding methods, to compare the results of laboratory and field studies of reservoir systems [2].

The developed methodology allows exploration of oil and gas objects using supercomputers and quantum computers based on the integration of geophysical data, comparing the results of geophysical and geological and technological research, to carry out multidimensional digital geological and geophysical modeling of oil and gas fields and oil and gas production clusters using data from manned complexes and unmanned robotic systems [3]. The supercomputer steganographic software and hardware complex integrates blocks for assessing the degree of reliability of the initial data and building knowledge bases (for example, on optimal methods of operating oil and gas fields in various conditions, methods of repair and reconstruction of oil and gas production facilities in existing fields, technologies for assessing declining production and the degree of applicability of field equipment on deposits with abnormal temperature and pressure parameters) [4].

The developed supercomputer steganographic software and hardware complex with a system of distributed registers allows to reduce losses during oil and gas production, minimize production costs with high requirements for the environmental safety of field operation, conduct environmental monitoring of oil and gas fields, distribute storage (due to the system of distributed registers) and promptly transmit data via high-speed closed communication channels (thanks to computer steganography methods) for processing by local quantum computing systems [5]. The information obtained is used to predict the development of oil and gas fields, create maps of «oil and gas production zones with a low carbon footprint», create environmentally friendly conditions for the development of oil and gas fields, prevent environmental pollution, conduct bioeconomic calculations using supercomputers and quantum computer systems [6]. Technology is protected by patent on invention in Russia and foreign countries [7].

References

1. *Rathkeen L.S. To the 90th jubilee of the first director of Physical and Technical Institute of Russian Academy of Sciences: quantonomics, quantum and technological initiative and quantum industry on the example of increasing of the level of diversification of financial and communicational corporations in the military and civil spheres // Investments in Russia. 2020. № 11 (310). Pp.35-38.*
2. *Burkhardt T., Stepanova D., Rathkeen L.S., Ismailov I., Lavrushin O., Sokolinskaya N., Danish M.S.S., Senjyu T., Yuksel S., Dinçer H. Introduction of biofuels as a way of solving ecological problems // International Journal of Energy Economics and Policy. 2021. V. 11. № 2. Pp. 187-193.*
3. *Rathkeen L.S. Problems of unmanned multipurpose complexes usage in the fuel and energy sphere // Technologies of fuel and energy sphere. 2007. № 2. Pp. 10-11.*
4. *Rathkeen L.S. Automated information system for the space ecological monitoring for the development of oil and gas fields with the usage of computer steganography // In the book: SCIENTIFIC SESSION Scientific Research Nuclear Center MEPHI-2015. Annotations of reports: in 3 volumes. Edited by O.N.Golotuk. 2015. P. 91a.*
5. *Rathkeen L.S. Quantum steganography and quantum supercomputers and its applications for minimization of risks of industrial production: «New economy» of nanoindustry// In the book: VIII Conference of Nanotechnological society of Russia. Thesis book. Scientific edition. Edited by D.S.Andreyuk. 2017. P.228-231.*
6. *Rathkeen L.S. Development of information system for distant education of specialists in the field of supercomputers and quantum-computing calculations with the usage of cryptography and computer steganography on the base «1C:Enterprise». // In the book: new information technologies in the education. Scientific reports of XXI International scientific and practical conference. Edited by D.V.Chistov. Moscow, 2021. Pp.474-476.*
7. *Rathkeen L.S. Russian patent on invention № 2322693.*

УДК 577.218 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-380-383

АНТИМИКРОБОЕ ДЕЙСТВИЕ ВИДОВ МЯТЫ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В СОЧИНСКОМ ПРИЧЕРНОМОРЬЕ

Рыбалко А.А.[1], **Рыбалко А.Е.**[1], **Агумава А.А.**[2]

[1] *Сочинский институт (филиал) ФГАОБУ ВО Российского университета дружбы народов.354348, Южный Федеральный округ, Краснодарский край, г. Сочи, ул. Куйбышева, 32 e-mail: sfrudn@rambler.ru*

[2] *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт медицинской приматологии" (ФГБНУ НИИ МП). 354376, Сочи, Адлерский з-н, с.Веселое, ул. Мира 177 e-mail: mail@primatologia.ru*

Проведены исследования по разработке технологии получения в культуре in vitro растений *M. longifolia* и *M. spicata*, произрастающих в Сочинском Причерноморье для получения биомассы как источника лекарственных субстанций. Методом полимеразной цепной реакции установлено подавляющее действие на энтеропатогенную кишечную палочку.

Ключевые слова: Mentha, культуре in vitro, нодальные экспланты, светодиоды, люминесцентные лампы, кишечная палочка.

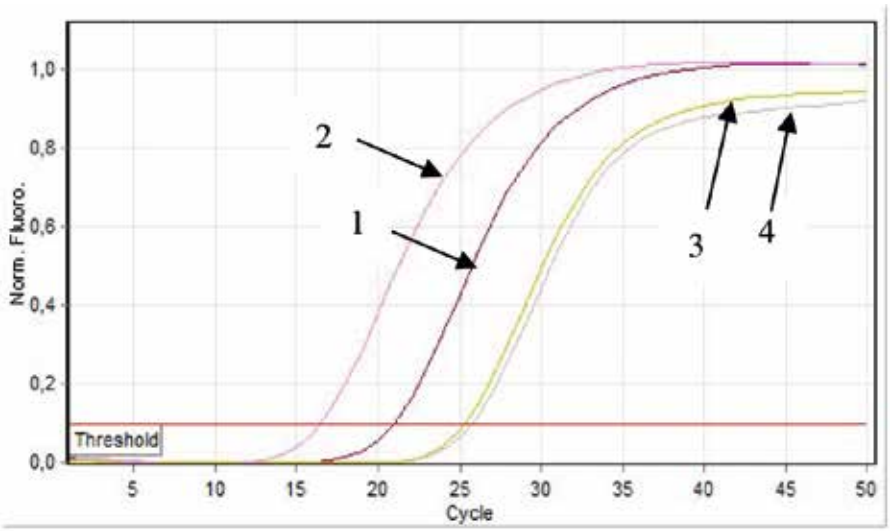
Род Mentha, насчитывающий более 30 видов, произрастает в мире почти во всех агроклиматических условиях (1). Некоторые из распространенных видов мяты, такие как M. aquatica, M. arvensis, M. citrata, M. longifolia, M.piperita, M. pulegium, M. rotuntifolia, и M. spicata обычно выращивают для производства эфирных масел (ЭО) и/или используются в качестве пищевых ароматизаторов и лекарственных средств во многих странах Европы, Австралии, Америки и Ближнего Востока.

На Кавказе произрастает по меньшей мере 4 вида мяты: M. aquatica, M. longifolia (длиннолистная), M. pulegium и M. spicata (2,3).

M. longifolia (мята кавказская), M. spiata L. (мята колосистая), отбирали в окрестностях села Красная Воля Адлерского района г. Сочи. Изучено влияние спектрального состава света (красные 70% + синие 30%) на рост и развитие растений в культуре in vitro: при освещении светодиодами растеньица были более равномерно сформированными и имели более интенсивную окраску, по сравнению с люминесцентными лампами.

Как показывают результаты исследования выращивание при освещении люминесцентными лампами, отдельными светодиодами –показали различные результаты. Так, наибольшее количество биомассы было получено при освещении светодиодными конструкциями (30% синих 460 нм и 70% красных – 660 нм),

В исследованиях по использованию нодальных эксплантов при введении в культуру in vitro применяли агаризованную среду Мурасиге и Скуга [4] с 1 мг/л бензиламинопурина, 0,1 мг/л α-нафтилуксусной кислоты в пробирках ПБ-16. Культуры выращивали при 16 ч светового режима и температуре 24±1°С.



Антимикробные исследования проведены методом полиме-разной цепной реакции. В этом исследовании использовали 70% гидроалкогольный экстракт мяты кавказской и мяты колосистой. На графике видно подавление репродукции энтеропатогенной кишечной палочки в течение 24 часов. Исходная концентрация бактерий составила 100 млн. копий на 1 мл (линия 1). Экстракты видов мяты значительно подавляли размножение бактерий и действовали практически одинаково (линии 3 и 4). В то время как без добавления экстракта концентрация бактерий увеличилась до 2 млрд. копий на 1 мл (линия 2).

Литература

1. *Gulluce, M. F., Shain, M., Sokmen, H., Ozer, D., Daferera, A., Sokmen, , Ozcan M. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. spp. longifolia. Food Chemistry, 103, 1449–1456.*

2. *Солодько А.С., Нагалевский М.В., Кирий П.В. Атлас флоры Сочинского Причерноморья. Дикорастущие сосудистые растения. – Сочи, 2006. – 287 с.*

3. *Черепанов С.К. Сосудистые растения Росссии и сопредельных государств. Санкт-Петербург, «Мири семья-95» 1995 – 992 с.*

4. *Murashige T, Skoog F. A rewised medium foe rapid growth and bioassays with tobacco culture // Physiologia plantarum,, 15, N 4. – 1962. – P. 473–479.*

UDC 577.218 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-380-383

ANTIMICROBIAL EFFECT OF SPECIES OF MINT GROWING IN THE SOCHI BLACK SEA REGION

Rybalko A.A.[1], **Rybalko A.E.**[1], **Agumava A.A.**[2]

[1] *Sochi Institute (branch) FSAEI HE Russian Peoples' Friendship University. 354348, Southern Federal District, Krasnodar Region, Sochi, st. Kuybysheva, 32*
Email: sfrudn@rambler.ru
[2] *Federal State Budget Scientific Institution "Research Institute of Medical Primatology" (FSBSI RI MP). 354376, Sochi, Adler district, s. Veseloe, st. World 177. E-mail: mail@primatologia.ru*

Research has been carried out to develop a technology for in vitro production of M. longifolia and M. spicata plants growing in the Sochi Black Sea region to obtain biomass as a source of medicinal substances. By the method of polymerase chain reaction, an inhibitory effect on enteropathogenic Escherichia coli has been established.

Key words: Mentha, in vitro culture, nodal explants, LEDs, fluorescent lamps, Escherichia coli.

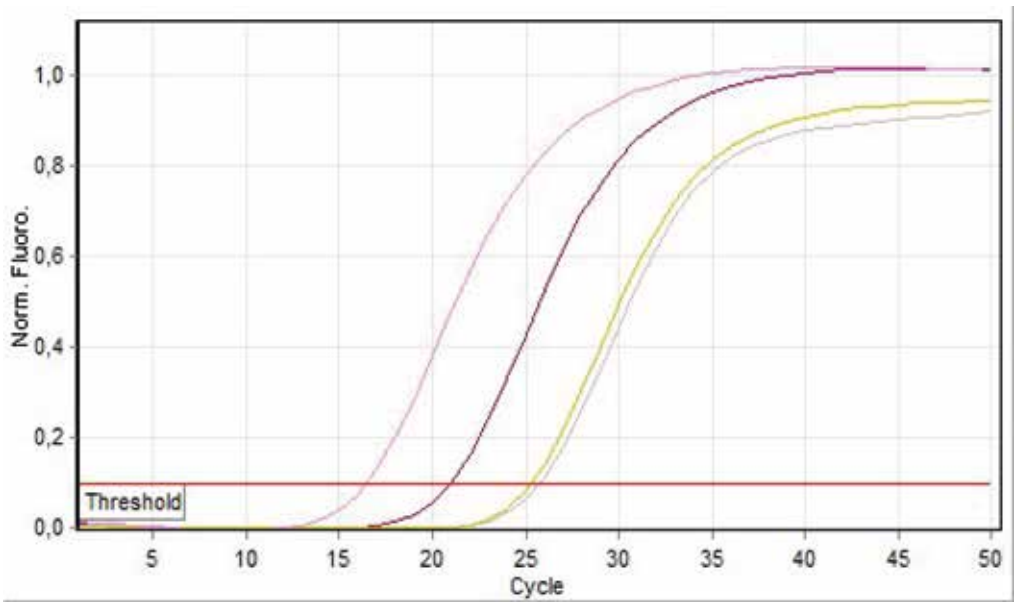
The genus Mentha, numbering more than 30 species, grows in the world in almost all agroclimatic conditions (1). Some of the common mint species such as M. aquatica, M. arvensis, M. citrata, M. longifolia, M. piperita, M. pulegium, M. rotuntifolia, and M. spicata are commonly grown to produce essential oils (EO) and/or used as food flavorings and medicines in many countries in Europe, Australia, America and the Middle East.

At least 4 species of mint grow in the Caucasus: M. aquatica, M. longifolia (longifolia), M. pulegium, and M. spicata (2,3).

M. longifolia (Caucasian mint), M. spiata L. (sper mint), were sampled in the vicinity of Krasnaya Volya village, Adler district, Sochi. The influence of the spectral composition of light (red 70% + blue 30%) on the growth and development of plants in vitro culture was studied: under illumination with LEDs, the plants were more uniformly formed and had a more saturated color compared to fluorescent lamps.

As the results of the study show, growing under illumination with fluorescent lamps, with individual LEDs, showed different results. Thus, the largest amount of biomass was obtained under illumination with LED structures (30% blue 460 nm and 70% red - 660 nm),

In studies on the use of nodal explants when introduced into culture in vitro, agar medium of Murashige and Skoog [4] with 1 mg / L benzylaminopurine, 0.1 mg/L α-naphthaleneacetic acid in test tubes was used. The cultures were grown under a 16 h light regime and a temperature of 24 ± 1 ° C.



Antimicrobial studies were carried out by the method of pollymerase chain reaction. In this study, 70% hydroalcoholic extract of M. longifolia and spearmint was used. The graph shows the suppression of the reproduction of enteropathogenic E. coli within 24 hours. The initial concentration of bacteria was 100 million copies per ml (line 1). Mint extracts significantly suppressed bacterial growth and acted almost identically (lines 3 and 4). While without the addition of the extract, the concentration of bacteria increased to 2 billion copies per ml (line 2).

References

1. *Gulluce, M. F., Shain, M., Sokmen, H., Ozer, D., Daferera, A., Sokmen,, Ozcan M. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. spp. longifolia. Food Chemistry, 103, 1449-1456.*
2. *Solodko A.S., Nagalevsky M.V., Kiriy P.V. Atlas of the flora of the Sochi Black Sea region. Wild vascular plants. - Sochi, 2006 .-- 287 p.*
3. *Cherepanov S.K. Vascular Plants of Russia and Neighboring States. St. Petersburg, "Miri family-95" 1995 - 992 p.*
4. *Murashige T, Skoog F. A rewised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture // Physiologia plantarum, 15, N 4. - 1962. - P. 473–479.*

УДК 543.068.8:543.63 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-383-385

МАГНИТНЫЕ НАНОКОМПОЗИТЫ В ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ДАТЧИКАХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛИФОСАТА

Фарафонова О.В., Смольянинова Д.М., Бизина Е.В., Ларина М.Ю., Ермолаева Т.Н.

Липецкий государственный технический университет, Липецк, Россия
398055, ул. Московская, д. 30
ov.farafonova@yandex.ru

Разработаны пьезоэлектрические гравиметрические сенсоры на основе магнитных нанокомпозитов: полимеров с молекулярными отпечатками (ПМО) Fe3O4@ПМО N – (фосфонметил) – глицин. Установлено, что оптимальное концентрационное соотношение темплата: функционального мономера: кросс-мономера составляет 1:3:25. Наилучшее время синтеза составляет 3 ч при постоянном перемешивании со скоростью 60 об/мин и нагреве до 60℃.

Ключевые слова: N – (фосфонметил) – глицин, глифосат, полимеры с молекулярными отпечатками, нанокомпозиты, метод «ядро-оболочка».

Проблема безопасности пищевых продуктов является регламентирующим фактором, определяющим здоровье людей. Обостряются вопросы, связанные с объективностью контроля качества пищевых продуктов, кормов, продукции растениеводства и животноводства, в частности, с определением пестицидов, способных аккумулироваться в почве, воде, сырье и продуктах его переработки. Глифосат (N – (фосфонметил) – глицин) является самым популярным неселективным системным гербицидом начиная с 1970-х годов. О его эффективности и в тоже время высокой вредности для людей споры не утихают и сегодня. Препарат запрещен к применению более, чем в 10 странах, однако в России он по-прежнему активно применяется.

Разработаны пьезоэлектрические гравиметрические сенсоры на основе магнитных нанокомпозитов: полимеров с молекулярными отпечатками (ПМО) Fe_3O_4@ПМО N – (фосфонметил) – глицин. Исследованы условия синтеза магнитных частиц полимеров с молекулярными отпечатками глифосата методом «ядро-оболочка».

Получение магнитных ядер осуществляли модифицированным методом соосаждения, далее проводили гидрофобизацию их поверхности олеиновой кислотой для облегчения закрепления полимерного слоя и затем синтезировали молекулярно-импринтированную полимерную «оболочку» методом свободной радикальной полимеризации с применением метакриловой кислоты и этиленгликольдиметокрилата.

Аналитический сигнал сенсора регистрировали при увеличении массы распознающего слоя на основе наночастиц ПМО при взаимодействии с глифосатом. При синтезе ПМО в качестве функционального мономера применяли метакриловую кислоту, кросс-мономера – этиленгликольдиметакрилат, инициатора

свободных радикалов – азобисизобутиронитрил, стабилизатором выступал повинилпирролидон. В ходе исследования установлено, что оптимальное концентрационное соотношение темплата: функционального мономера: кросс-мономера составляет 1:3:25, при этом наблюдается наиболее стабильный отклик сенсора, а способность повторного встраивания является наилучшей, поскольку происходит полное удаление молекул темплата. Наилучшее время синтеза составляет 3 ч при постоянном перемешивании со скоростью 60 об/мин и нагреве до 60℃.

Иммобилизация частиц на поверхности электрода осуществлялась при применении «spin-coating»-способа, то есть способа формирования покрытия при вращении с постоянной скоростью, что способствует получению на поверхности электрода пленки одинаковой толщины. Важной стадией является выбор регенерирующего раствора. При применении для регенерации бидистиллированной воды наибольшее количество глифосата удалялось в первые 1-2 мин, а затем наночастицы на поверхности сенсора набухали. Повторного встраивания молекул темплата при таком извлечении не наблюдалось. Использование для регенерации покрытия сенсора раствора, содержащего уксусную кислоту и воду в соотношении 1:70, позволило получить воспроизводимые результаты - удаление темплата подчинялось экспоненциальной зависимости и через 4 мин происходило максимальное извлечение. Повторное встраивание молекул глифосата в полимерную пленку происходило за 5 мин, с максимальным значением 0,86 мкг. При дальнейшем встраивании происходила потеря массы полимерной пленки. Это может быть связано с тем, что при длительном контакте с жидкостью происходит разрушение пленки. Поэтому было выбрано оптимальное время повторного встраивания – 5 минут.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Липецкой области в рамках научного проекта № 20-43-480001.

UDC 543.068.8: 543.63 DOI:10.37747/2312-640X-2021-19-383-385

MAGNETIC NANOCOMPOSITES IN PIEZOELECTRIC SENSORS FOR DETERMINATION OF GLYPHOSATE

Farafonova O.V., Smolyaninova D.M., Bizina E.V., Larina M.Yu., Ermolaeva T.N.

Lipetsk State Technical University, Lipetsk, Russia
398055, st. Moscow, 30
ov.farafonova@yandex.ru

Piezoelectric gravimetric sensors based on magnetic nanocomposites: polymers with molecular imprints (MIP) Fe3O4@MIP N - (phosphonmethyl) - glycine have been developed. It was found that the optimal concentration ratio of template: functional monomer: cross-monomer is 1: 3: 25. The best synthesis time is 3h with constant stirring at a speed of 60 rpm and heating to 60 ℃.

Keywords: N - (phosphonmethyl) - glycine, glyphosate, molecular imprinted polymers, nanocomposites, core-shell method.

Food safety is a regulatory determinant of human health. The issues related to the objectivity of quality control of food, feed, crop, and livestock products with the definition of pesticides that can accumulate in soil, water, raw materials, and products of its processing, are becoming more acute. Glyphosate (N - (phosphonomethyl) - glycine) has been the most popular non-selective systemic herbicide since the 1970s. Disputes about its effectiveness and at the same time high harmfulness for people do not subside today. The drug is banned for use in more than 10 countries, but in Russia it is still actively used.

Piezoelectric gravimetric sensors based on magnetic nanocomposites: polymers with molecular imprints (MIP) Fe_3O_4@MIP N - (phosphonmethyl) - glycine have been developed. The conditions for the synthesis of magnetic particles of polymers with molecular imprints of glyphosate by the "core-shell" method were investigated.

Magnetic cores were obtained by a modified coprecipitation method, then their surface was hydrophobized with oleic acid to facilitate fixation of the polymer layer, and then a molecularly imprinted polymer "shell" was synthesized by free radical polymerization using methacrylic acid and ethylene glycol dimethocrylate.

The analytical signal of the sensor was recorded with an increase in the mass of the recognition layer based on MIP nanoparticles upon interaction with glyphosate. In the MIP synthesis methacrylic acid was used as a functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate was used as a cross-monomer, azobisisobutyronitrile was a

free radical initiator, and povinylpyrrolidone was used as a stabilizer. During the study, it was found that the optimal concentration ratio of template: functional monomer: cross-monomer is 1: 3: 25, while the most stable sensor response is observed, and the ability of re-embedding is the best, since the complete removal of template molecules occurs. The best synthesis time is 3 hours with constant stirring at a speed of 60 rpm and heating to 60 ℃.

The immobilization of particles on the electrode surface was carried out using the "spin-coating" method, that is, the method of forming a coating while rotating at a constant speed, which contributes to obtaining a film of the same thickness on the electrode surface. An important step is the selection of a regeneration solution. When bidistilled water was used for regeneration, the largest amount of glyphosate was removed in the first 1–2 min, and then the nanoparticles on the sensor surface swelled. Re-incorporation of template molecules was not observed with this extraction. The use of a solution containing acetic acid and water in a ratio of 1: 70 for the regeneration of the sensor coating made it possible to obtain reproducible results - the removal of the template obeyed an exponential dependence, and after 4 min the maximum extraction occurred. Re-incorporation of glyphosate molecules into the polymer film occurred in 5 min, with a maximum value of 0.86 μg. With further embedding, the weight of the polymer film was lost. This may be due to the fact that with prolonged contact with the liquid, the film is destroyed. Therefore, the optimal re-embedding time was chosen as 5 minutes.

The research was funded by RFBR and Lipetsk Region, project number 20-43-480001.