МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС

БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

ВЫПУСК 21

25 СЕНТЯБРЯ 2023
МОСКВА

INTERNATIONAL CONGRESS

BIOTECHNOLOGY: STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES

ISSUE 21

25 SEPTEMBER, 2023
MOSCOW

WWW.BIOMOS.RU

2023

МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС «БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ»

Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития»
25 СЕНТЯБРЯ 2023 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-2023-21

© ООО “ЭКСПО-БИОХИМ-ТЕХНОЛОГИИ”
129090, г. Москва, 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»
25 SEPTEMBER, 2023

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-2023-21

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

Биотехнология и медицина / *Biotechnology and medicine* 9

1. Бактериофаги в биотехнологии, сельском хозяйстве и медицине /
Bacteriophages in biotechnology, medicine and agriculture 9

2. Биоматериалы нового поколения для медицины и промышленности /
New generation biomaterials for medicine and industry 15

3. Внеклеточные везикулы и циркулирующие микроРНК /
Extracellular vesicles and circulating microRNA 29

4. Нанобиотехнологии в медицине / *Nanobiotecnology in medicine* 33

5. Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение /
Digital biodesign and personalised healthcare 53

Биофарма / *Biopharmaceutics* 88

6. 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 88

7. От клеточных технологий к персонализированной медицине/
From cell technologies to personalized medicine 92

Биоэкономика / *Bioeconomics* 100

8. Биоаналитические технологии:
Новые решения для применения в медицине и сельском хозяйстве /
Bioanalytic technologies in medicine and agriculture 100

9. Биокаталитические технологии / *Biocatalysis and technologies* 107

10. Биологическая трансформация загрязнений в окружающей среде:
закономерности и практические аспекты /
Biological transformations of contaminants in the natural environment: patterns and practical aspects 113

11. Генетические ресурсы и биотехнологические процессы
для пищевой и кормовой промышленности /
Genetic resources and biotechnology processes in food and feed industry 118

12. О подготовке высококвалифицированных биотехнологических кадров,
в том числе, для генетических технологий /
Training of highly qualified specialists in biotechnology and gene engineering 131

13. Микробиологические подходы в создании сельскохозяйственных культур
в растениеводстве с улучшенными хозяйственно-ценными признаками/
Microbiology approach to crop development with economic characters in plant growing 136

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

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

БАКТЕРИОФАГИ В БИОТЕХНОЛОГИИ, СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ И МЕДИЦИНЕ

BACTERIOPHAGES IN BIOTECHNOLOGY, MEDICINE AND AGRICULTURE

1. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМБИНАЦИЙ ЭНДОЛИЗИНА LYSAM24-SMAP С АНТИБИОТИКАМИ В ОТНОШЕНИИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ ГРУППЫ ESKAPE
Аршинов Я.Р., Антонова Н.П., Григорьев И.В., Лебедева С.А., Гущин В.А., Васина Д.В. 10

COMBINATIONS EFFICACY OF ENDOLYSIN LYSAM24-SMAP WITH ANTIBIOTICS AGAINST GRAM-NEGATIVE PATHOGENS OF THE ESKAPE GROUP
I.R. Arshinov, N.P. Antonova, I.V. Grigoriev, S.A. Lebedeva, V.A. Gushchin, D.V. Vasina 11

2. МАСШТАБИРОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА, ПОЛУЧЕННОГО В СИСТЕМЕ *ESCHERICHIA COLI* В РАСТВОРИМОЙ ФОРМЕ
Е.А. Волосникова, Т.И. Есина, Д.Н. Щербаков, Я.С. Гогина, Т.А. Терещенко, Н.В. Волкова, С.В. Усова, Е.С. Башкина, Е.Д. Даниленко 12

SCALING THE TECHNOLOGY FOR PRODUCTION OF SOLUBLE RECOMBINANT INTERFERON GAMMA IN *THE ESCHERICHIA COLI* EXPRESSION SYSTEM
E.A. Volosnikova, T.I. Esina, D.N. Shcherbakov, Ya.S. Gogina, T.A. Tereshchenko, N.V. Volkova, S.V. Usova, E.S. Bashkina, E.D. Danilenko 13

УДК: 579.61, 615.339 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-10-12

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМБИНАЦИЙ ЭНДОЛИЗИНА LYSAM24-SMAP С АНТИБИОТИКАМИ В ОТНОШЕНИИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ ГРУППЫ ESKAPE

Аршинов Я.Р.[1,2], Антонова Н.П.[1], Григорьев И.В.[1], Лебедева С.А.[2], Гущин В.А.[1], Васина Д.В.[1]

[1] Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18
[2] Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
e-mail: yarik0707@list.ru

Рассмотрены комбинации антибиотиков с эндолизином, показавшие свою эффективность против представителей грамотрицательных бактерий группы ESKAPE. Наибольшую эффективность эндолизин проявлял в комбинации с полимиксином Б, а также хлорамфениколом и тетрациклином.

Ключевые слова: эндолизин; ESKAPE; антибиотики; синергизм; энзибиотики

Распространение лекарственной устойчивости среди таких грамотрицательных патогенов-представителей ESKAPE группы ведёт к снижению эффективности применения стандартной антимикробной терапии. Одним из решений этой проблемы может стать терапия на основе энзибиотиков - нативных или модифицированных литических ферментов бактериофагов или эндолизинов. Эти ферменты обладают высокой активностью в отношении грамотрицательных бактерий, независимо от статуса устойчивости к антибиотическим препаратам. Известно также, что эндолизины способны восстанавливать утраченную чувствительность микроорганизмов к антибиотическим агентам. Ввиду высокой стоимости производства и сравнительно низкой стабильности эндолизинов, сейчас наиболее перспективным направлением является их использование именно в комбинации с существующими антибиотиками.

С целью изучения перспектив комбинированного применения лизинов и антимикробных средств различных классов против клинических изолятов полирезистентных грамотрицательных бактерий, было проведено исследование сочетанного действия рекомбинантной модифицированной мурамидазы LysAm24-SMAP с антибиотиками (АБ) различных классов (полимиксин Б, хлорамфеникол, ампициллин, тетрациклин, цефотаксим) для шести клинических изолятов *A. baumannii, P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*. В качестве методики оценки снижения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) антибиотиков в присутствии эндолизина выбрали модифицированный «метод шахматной доски», основанный на оценке минимальных индексов фракционных ингибирующих концентраций ($FICI_{min}$). Практически все штаммы проявляли устойчивость более, чем к одному из исследуемых антибиотиков, при этом МИК LysAm24-SMAP удалось определить лишь для *A. baumannii* 50-16, она составила 64 мкг/мл.

Была показана высокая эффективность, выражающаяся в синергетическом эффекте, наблюдалась в комбинации LysAm24-SMAP с полимиксином Б, при этом, наиболее эффективными были комбинации «эндолизин-полимиксин Б»: показавшие снижение МИК антибиотика в 8-32 раза, в зависимости от исследованного бактериального вида (Рис.1).

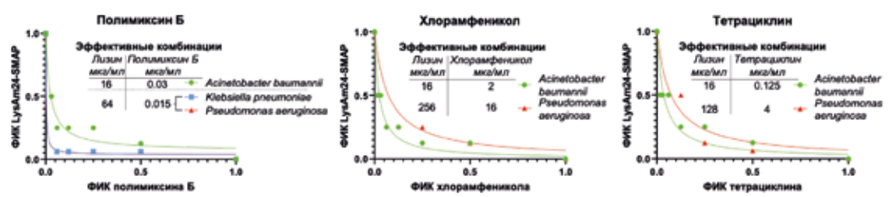

Рисунок 1. Изоболограммы эффективных комбинаций АБ - LysAm24-SMAP.

Для других исследованных антибиотиков эффект был менее выраженным, однако и для них были установлены эффективные комбинации. Для хлорамфеникола: 16 мкг/мл – 2 мкг/мл для *A. baumannii* 50-16 и 256 мкг/мл – 16 мкг/мл для *P. aeruginosa* ATCC 9027; для тетрациклина: 16 мкг/мл – 0,125 мкг/мл для *A. baumannii* 50-16 и 128 мкг/мл – 4 мкг/мл для *P. aeruginosa* ATCC 9027; для цефотаксима: 256 мкг/мл – 2 мкг/мл для *P. aeruginosa* ATCC 9027. Согласно полученным результатам, совместное использование энзибиотиков, содержащих LysAm24-SMAP, и классических противомикробных средств способно привести к значительному снижению эффективных концентраций обоих препаратов без потери их ингибирующей активности, что в перспективе, позволит снизить терапевтические дозы препаратов и развитие нежелательных эффектов от их применения.

UDC: 579.61, 615.339 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-10-12

COMBINATIONS EFFICACY OF ENDOLYSIN LYSAM24-SMAP WITH ANTIBIOTICS AGAINST GRAM-NEGATIVE PATHOGENS OF THE ESKAPE GROUP

I.R. Arshinov[1,2], N.P. Antonova[1], I.V. Grigoriev[1], S.A. Lebedeva[2], V.A. Gushchin[1], D.V. Vasina[1]

[1] N. F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098 Russia, Moscow, Gamaleya str., 18
[2] I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University). 119991 Russia, Moscow, 8 Trubetskaya St., bld. 2

The considered combinations of antibiotics with the studied endolysin showed their efficacy against some representatives of Gram-negative bacteria of ESKAPE group. Endolysin showed the greatest efficacy together with polymyxin B, as well as with chloramphenicol and tetracycline.

Keywords: endolysin; ESKAPE; antibiotics; synergism; enzybiotics

The spread of drug resistance among such Gram-negative ESKAPE pathogens as *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* leads to a decrease in the effectiveness of standard antimicrobial therapy. One solution to this problem could be enzyme-based therapy - native or modified bacteriolytic enzymes of bacteriophages or endolysins. These enzymes are highly active against Gram-negative bacteria, regardless of their antibiotic resistance status, because they act on highly conserved targets. Endolysins are known to be able to restore the lost sensitivity of microorganisms to antibiotic agents. At the same time, due to the high production cost and relatively low stability of endolysins, the most promising direction today is their use in combination with existing antibiotics as adjuvant therapy.

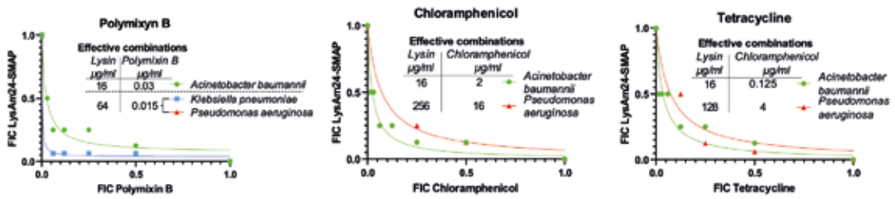

Figure 1. Isobolograms of effective AB - LysAm24-SMAP combinations

In order to study the prospects of combined use of lysins and antimicrobial agents of different classes against clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacteria, a study of the combined effect of recombinant modified muramidase LysAm24-SMAP with antibiotics (AB) of different classes (polymyxin B, chloramphenicol, ampicillin, tetracycline, cefotaxime) was performed for six clinical isolates of *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, and *K. pneumoniae*. A modified "checkerboard method" based on the estimation of minimum fractional inhibitory concentration indices ($FICI_{min}$) was chosen as a method to evaluate the reduction of minimum inhibitory concentrations (MIC) of antibiotics in the presence of endolysin. Almost all strains showed resistance to more than

one of the studied antibiotics, while the LysAm24-SMAP MIC was estimated only for *A. baumannii* 50-16, which was 64 μg/ml. A high efficacy, expressed in synergistic effect, was observed in the combination of LysAm24-SMAP with polymyxin B, with the "endolysin-polymyxin B" combinations being the most effective with 8-32-fold reduction in the MIC of the antibiotic, depending on the bacterial species studied (Fig.1).

For other antibiotics studied, the effect was less pronounced, but effective combinations were identified. Thus, for chloramphenicol they were: 16 μg/mL – 2 μg/mL for *A. baumannii* 50-16 and 256 μg/mL – 16 μg/mL for *P. aeruginosa* ATCC 9027; for tetracycline: 16 μg/mL – 0.125 μg/mL for *A. baumannii* 50-16 and 128 μg/mL – 4 μg/mL for *P. aeruginosa* ATCC 9027; for cefotaxime: 256 μg/mL – 2 μg/mL for *P. aeruginosa* ATCC 9027. According to the results obtained, the combined use of enzibiotics containing LysAm24-SMAP and classical antimicrobial agents can lead to a significant decrease in the effective concentrations of both drugs without loss of their inhibitory activity, which in the long term, will reduce therapeutic doses of drugs and development of adverse effects from their use.

УДК 577.112.083 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-12-13

МАСШТАБИРОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА, ПОЛУЧЕННОГО В СИСТЕМЕ ESCHERICHIA COLI В РАСТВОРИМОЙ ФОРМЕ

Е.А. Волосникова, Т.И. Есина, Д.Н. Щербаков, Я.С. Гогина,
Т.А. Терещенко, Н.В. Волкова, С.В. Усова, Е.С. Башкина, Е.Д. Даниленко

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора,
630559, Россия, НСО, р.п. Кольцово
e-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru

Показано масштабирование процесса получения рекомбинантного интерферона-гамма (ИНФ- γ), полученного в системе *Escherichia coli* в растворимой форме. Определены оптимальные условия культивирования в жидкой питательной среде объемом от 70 до 250 л. Проведено масштабирование разработанного процесса в 50 раз. Разработанный способ позволяет получать высокоочищенный белок ИНФ- γ полупромышленных объемах.

Ключевые слова: рекомбинантный интерферон гамма человека, штамм-продуцент, культивирование, хроматография, масштабирование, специфическая активность.

Использование препаратов рекомбинантных белков-цитокинов в медицине в качестве иммуномодуляторов, противоопухолевых и противовирусных лекарственных средств не теряет своей актуальности. Объектом исследования данной работы являлся рекомбинантный интерферон гамма (ИФН-γ) человека, цитокин, обладающий иммуномодулирующей и противовирусной активностью.

Для получения ИФН-γ методом микробного синтеза использовали штамм E.coli BL 21/pET-IFN-γ, несущий рекомбинантную плазмиду pET-IFN-γ, кодирующую нуклеотидную последовательность ИФН-γ. Как было показано ранее, данный штамм-продуцент синтезирует целевой белок преимущественно в растворимой форме.

Цель работы состояла в оптимизации и масштабировании технологии получения ИФН-γ и изучении его биологических свойств. Для масштабирования процесса использовали ферментеры разного объема от 100 до 350 л. Для выделения и очистки целевого белка применяли жидкий сорбент Аммофлок-25 и ионообменные сорбенты. Концентрацию белка определяли методом Лоури. Определение специфической противовирусной активности препарата проводили в культуре диплоидных фибробластов человека клеток L-68 с использованием в качестве тест-вируса вируса энцефаломиелокардита штамм Колумбия в дозе 100 ЦПД50 относительно препарата Ингарон.

В ходе работы определены оптимальные условия культивирования штамма Escherichia coli BL 21/pET-IFN-γ, продуцента ИФН-γ, в жидких питательных средах разного состава объемом от 70 до 250 л для максимального синтеза ИФН-γ в растворимой форме. Показано, что биомасса, полученная в выбранных условиях, содержит от 33 до 43 % целевого белка от общего количества клеточного белка и удельным выходом от 4.6 до 7.9 г из 1 л культуральной жидкости. Оптимизирована методика выделения и очистки

целевого белка, проведено 50-кратное масштабирование разработанного процесса с сохранением уровня показателей, ранее достигнутых при разработке лабораторной технологии. Разработанная опытно-промышленная технология позволяет получать с 1 г влажной биомассы до 5 мг высокоочищенного ИФН-γ с высокой специфической активностью, что превышает показатели выхода белка с использованием ранее описанных технологий, по меньшей мере, в 2 раза.

Представленный способ позволяет получать в полупромышленных объемах высокоочищенный препарат ИФН-γ с высокой противовирусной активностью.

Работа выполнена в рамках тематики Государственного задания, Тема ГЗ-39/21 «Отработка технологии препаративной наработки и очистки рекомбинантных белков».

UDC 577.112.083 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-12-13

SCALING THE TECHNOLOGY FOR PRODUCTION OF SOLUBLE RECOMBINANT INTERFERON GAMMA IN THE ESCHERICHIA COLI EXPRESSION SYSTEM

E.A. Volosnikova, T.I. Esina, D.N. Shcherbakov, Ya.S. Gogina,
T.A. Tereshchenko, N.V. Volkova, S.V. Usova, E.S. Bashkina, E.D. Danilenko

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor,
630559, Novosibirsk oblast, Koltsovo, Russia
e-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru

In this work, we scaled the process of obtaining recombinant interferon-gamma (INF-γ) produced in the *Escherichia coli system* in a soluble form. Optimal conditions for cultivation in liquid nutrient media of the volume from 70 to 250 liters have been determined. The developed process has been scaled 50-fold. The method described makes it possible to obtain highly purified INF- γ protein in semi-industrial volumes.

Keywords: recombinant human gamma interferon, producer strain, cultivation, chromatography, scaling, specific activity.

The use of the drugs based on recombinant cytokines in medicine as immunomodulating, antitumor, and antiviral therapeutics does not lose its relevance. The object of the present study was the recombinant human interferon gamma (IFN-γ), cytokine, exerting immunomodulating and antiviral activity.

Escherichia coli BL 21/pET-IFN-γ strain carrying the recombinant plasmid pET-IFN-γ that encodes the nucleotide sequence of IFN-γ was used for the production of IFN-γ by microbial synthesis. As shown earlier, this producer strain synthesizes the target protein mainly in a soluble form.

The aim of the work was to optimize and scale up the technology for obtaining IFN-γ and study its biological properties. To scale up the technology, the fermenters of different volumes from 100 to 350 liters were used. The liquid sorbent, Ammoflok-25, and ion exchange sorbents were used for isolation and purification of the target protein. The protein concentration was determined by the Lowry method. The specific antiviral activity of the resulting preparation was estimated in the culture of diploid human fibroblasts L-68 against the encephalomyelocarditis virus (Columbia strain) at a dose of 100 CPD50 relative to Ingaron drug.

Optimal conditions for cultivation of Escherichia coli BL 21/pET-IFN-γ, a producer strain of interferon gamma, in liquid nutrient media of a different composition and volume (70 - 250 liters) have been determined to provide maximal synthesis of IFN-γ in a soluble form. It has been shown that the selected conditions make it possible to obtain biomass comprising a target protein of 33 to 43% content of the total cellular protein and a specific yield of 4.6 to 7.9 g from 1 liter of culture fluid. The methodology of isolation and purification of the target protein has been optimized, a 50-fold scaling up of the developed process has been carried out maintaining the indicators previously achieved during the development of the laboratory technology. The developed pilot technology allows obtaining up to 5 mg of IFN-γ of high purity and specific activity from 1 g of wet biomass, which exceeds the protein yield by at least 2 times compared to previously described technologies.

The presented method allows obtaining in semi-industrial volumes a highly purified IFN-γ preparation with high antiviral activity.

The research was carried out within the framework of the State Task 39/21 "Development of technology for preparative production and purification of recombinant proteins".

БИОМАТЕРИАЛЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ И ПРОМЫШЛЕННОСТИ

NEW GENERATION BIOMATERIALS FOR MEDICINE AND INDUSTRY

1. БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГИБРИДНЫЕ ИМПЛАНТАТЫ НА ОСНОВЕ ГЕЛЛАН-КСАНТАНОВОГО ГИДРОГЕЛЯ С ДИОПСИДОМ И РЕКОМБИНАНТНЫМИ BMP- И ЛИЗОСТАФИНОМ:
1. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА, КИНЕТИКА ВЫХОДА БЕЛКОВ
Карягина А.С., Даценко В.П., Жулина А.В., Попонова М.С., Булыгина И.Н., Грунина Т.М., Громова М.С., Сенатов Ф.С., Лунин В.Г., Громов А.В. 17

DUAL FUNCTIONAL HYBRID IMPLANTS BASED ON GELLAN-XANTHAN HYDROGEL WITH DIOPSIDE, RECOMBINANT BMP- AND LYSOSTAPHIN:
1. PRODUCTION AND CHARACTERIZATION, PROTEIN RELEASE KINETICS
A.S. Karyagina, V.P. Datsenko, A.V. Zhulina, M.S. Poponova, I.N. Bulygina, T.M. Grunina, M.S. Gromova, F.S. Senatov, V.G. Lunin, A.V. Gromov 18

2. БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГИБРИДНЫЕ ИМПЛАНТАТЫ НА ОСНОВЕ ГЕЛЛАН-КСАНТАНОВОГО ГИДРОГЕЛЯ С ДИОПСИДОМ И РЕКОМБИНАНТНЫМИ BMP- И ЛИЗОСТАФИНОМ:
2. БИОСОВМЕСТИМОСТЬ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ IN VITRO
Карягина А.С., Кудан Е.В., Кудинова А.Г., Гришин А.В., Грунина Т.М., Даценко В.П., Жулина А.В., Громова М.С., Булыгина И.Н., Сенатов Ф.С., Лунин В.Г., Громов А.В. 19

DUAL FUNCTIONAL HYBRID IMPLANTS BASED ON GELLAN-XANTHAN HYDROGEL WITH DIOPSIDE, RECOMBINANT BMP- AND LYSOSTAPHIN:
2. BIOCOMPATIBILITY AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY IN VITRO
A.S. Karyagina, E.V. Koudan, A.G. Kudinova, A.V. Grishin, T.M. Grunina, B.P. Datsenko, A.V. Zhulina, M.S. Gromova, I.N. Bulygina, F.S. Senatov, V.G. Lunin, A.V. Gromov 20

3. БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГИБРИДНЫЕ ИМПЛАНТАТЫ НА ОСНОВЕ ГЕЛЛАН-КСАНТАНОВОГО ГИДРОГЕЛЯ С ДИОПСИДОМ И РЕКОМБИНАНТНЫМИ BMP- И ЛИЗОСТАФИНОМ:
3. РЕПАРАЦИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ НА ФОНЕ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ
Карягина А.С., Орлова П.А., Жулина А.В., Кривозубов М.С., Грунина Т.М., Кудинова А.Г., Гришин А.В., Даценко В.П., Зайцева С.В., Струкова Н.В., Генералова М.С., Рязанова А.В., Громова М.С., Булыгина И.Н., Манских В.Н. , Сенатов Ф.С., Лунин В.Г., Громов А.В. 21

DUAL FUNCTIONAL HYBRID IMPLANTS BASED ON GELLAN-XANTHAN HYDROGEL WITH DIOPSIDE, RECOMBINANT BMP- AND LYSOSTAPHIN:
3. BONE DEFECT REPARATION AMID STAPHYLOCOCCUS AUREUS INFECTION
A.S. Karyagina, P.A. Orlova, A.V. Zhulina, M.S. Krivozubov, T.M. Grunina, A.G. Kudinova, A.V. Grishin, B.P. Datsenko, S.V. Zaitseva, N.V. Strukova, M.S. Generalova, A.V. Ryazanova, M.S. Gromova, I.N. Bulygina, V.N. Manskikh, F.S. Senatov, V.G. Lunin, A.V. Gromov....22

4. IN VITRO ИССЛЕДОВАНИЕ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСНЫХ КОНСТРУКЦИЙ С ГЕНОМ BMP-, ПОЛИЛАКТИДНЫХ ГРАНУЛ, КОЛЛАГЕН И ФИБРИНА
Мокроусова В.О., Недорубова И.А., Меглей А.Ю., Басина В.П., Васильев А.В., Гольдштейн Д.В., Бухарова Т.Б....23

IN VITRO STUDY OF MATRICES BASED ON ADENOVIRAL CONSTRUCTS WITH THE BMP- GENE, POLYLACTIDE GRANULES, COLLAGEN AND FIBRIN.
V.O. Mokrousova, I.A. Nedorubova, A.YU. Meglei, V.P. Basina, A.V. Vasilyev, D.V. Goldstein, T.B. Bukharova....24

5. ОЦЕНКА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ С, ПОЛУЧЕННОЙ В СИСТЕМЕ BACILLUS MOJAVENSIS
Чиркова В.Ю., Щербаков Д.Н., Шарлаева Е.А., Ширманов М.В., Колосов П.В., Колосова Е.А., Иркитова А.Н., Малкова А.В., Дудник Д.Е., Каргашилова Е.Н., Евдокимов И.Ю. 25

EVALUATION OF THE ENZYMATIC ACTIVITY OF RECOMBINANT PHOSPHOLIPASE C PRODUCED IN THE BACILLUS MOJAVENSIS SYSTEM
V.Yu. Chirkova, D.N. Shcherbakov, E.A. Sharlaeva, M.V. Shirmanov, P.V. Kolosov, E.A. Kolosova, A.N. Irkitova, A.V. Malkova, D.E. Dudnik, E.N. Kargashilova, I.Yu. Evdokimov 26

УДК 57.016 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-17-18

БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГИБРИДНЫЕ ИМПЛАНТАТЫ НА ОСНОВЕ ГЕЛЛАН-КСАНТАНОВОГО ГИДРОГЕЛЯ С ДИОПСИДОМ И РЕКОМБИНАНТНЫМИ BMP-2 И ЛИЗОСТАФИНОМ: 1. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА, КИНЕТИКА ВЫХОДА БЕЛКОВ

Карягина А.С.[1,2,3*], Даценко В.П.[1], Жулина А.В.[1], Попонова М.С.[1], Булыгина И.Н.[1,4], Грунина Т.М.[1,3], Громова М.С.[1], Сенатов Ф.С.[1,4], Лунин В.Г.[1,3], Громов А.В.[1]

[1] Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18
[2] НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40
[3] Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42
[4] Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», Россия 119049, Москва, Ленинский пр-т, д. 4, стр. 1
** e-mail: akaryagina@gmail.com*

На основе геллан-ксантанового гидрогеля с диопсидом и рекомбинантными BMP-2 и лизостафином получены бифункциональные имплантаты, кинетика выхода белков из которых соответствует заданным параметрам: для элиминации стафилококка выход лизостафина происходит в первые часы после имплантации, выход BMP-2 происходит постепенно в течении не менее двух недель.

Ключевые слова: BMP-2, лизостафин, имплантаты, гидрогели, золотистый стафилококк

Для предупреждения развития инфекции при оперативном лечении патологий костной ткани и/или использования одноэтапного лечения инфицированных дефектов костной ткани перспективной является разработка остеопластических материалов нового поколения, обладающих одновременно остеогенной и антибактериальной активностью. Основным возбудителем, вызывающим остеомиелит, является золотистый стафилококк. В последнее время широкое распространение получили метициллинрезистентные (MRSA) штаммы стафилококка, что затрудняет лечение стафилококковой инфекции с использованием стандартной антибиотикотерапии. Универсальным средством для борьбы с любыми штаммами золотистого стафилококка могут быть ферментные препараты, действующие на бактериальную стенку, в частности, лизостафин из *Staphylococcus simulans*. Целью исследования была разработка бифункциональных гибридных имплантатов, обладающих одновременно антибактериальным и остеоиндуктивным действием, обеспечивающимся за счёт присутствия в них рекомбинантных белков лизостафина и костного морфогенетического белка-2 (BMP-2), основного белкового фактора роста и регенерации костной ткани. При этом важной задачей было достичь заданных параметров кинетики выхода белков: для элиминации инфекции массированный выход лизостафина должен был происходить в первые часы после имплантации, выход же BMP-2, обеспечивающего остеогенез, должен был происходить постепенно, на протяжении не менее двух недель. Полученные гибридные имплантаты были сформированы на основе геллан-ксантанового гидрогеля, содержащего порошок кальций-магниевой силикатной керамики диопсида. Диопсид был предварительно насыщен рекомбинантным BMP-2 (ранее была показана очень высокая ёмкость диопсида (более 150 мкг/мг) по отношению к BMP-2[1]). Рекомбинантный лизостафин, полученный по разработанной нами методике [2] вводили непосредственно в смесь геллановой и ксантановой камедей при формировании гидрогелей. Гидрогели лиофилизировали и проводили СЭМ, ИК-Фурье спектроскопию, оценивали набухание, кинетику выхода белков с помощью ИФА. Диопсид распределен равномерно, пористость составила 60%, а форма и размер пор похожи на таковые у нативной трубчатой кости. Набухание высушенных гидрогелей в PBS происходит очень быстро – в первые 5-10 мин. Через 60 мин степень набухания уже не меняется и составляет около 20% для гидрогелей без диопсида и 10% для гидрогелей с 0,5 – 3% диопсида. Кинетика выхода белков соответствует заявленной – основная масса лизостафина выходит за первые 24 часа, выход BMP-2 происходит постепенно, по протяжении двух недель эксперимента. Полученные имплантаты обладают необходимыми свойствами и перспективны для проведения дальнейших *in vitro* и *in vivo* исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 22-15-00216.

Литература:

1. *Karyagina A. S. et al. // Hybrid implants based on calcium-magnesium silicate ceramics diopside as a carrier of recombinant BMP-2 and demineralized bone matrix as a scaffold: dynamics of reparative osteogenesis in a mouse craniotomy model. Biochemistry (Mosc). — 2022. — Vol. 87. — P. 1277-1291.*
2. *Shestak N. V. et al. // The choice of chromatographic resin for the purification of recombinant lysostaphin affects its activity. Protein expression and purification. — 2023. — Vol. 207. — 106274.*

UDC 57.016 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-17-18

DUAL FUNCTIONAL HYBRID IMPLANTS BASED ON GELLAN-XANTHAN HYDROGEL WITH DIOPSIDE, RECOMBINANT BMP-2 AND LYSOSTAPHIN: 1. PRODUCTION AND CHARACTERIZATION, PROTEIN RELEASE KINETICS

A.S. Karyagina[1,2,3*], V.P. Datsenko[1], A.V. Zhulina[1], M.S. Poponova[1], I.N. Bulygina[1,4], T.M. Grunina[1,3], M.S. Gromova[1], F.S. Senatov[1,4], V.G. Lunin[1,3], A.V. Gromov[1]

[1] Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098 Russia, Moscow, Gamaleya str., 18
[2] Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119992 Russia, Moscow, Leninskie gory, 1
[3] All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Sciences, 127550 Russia, Moscow, Timiryazevskaya str., 42
[4] National University of Science and Technology "MISIS", 119049 Russia, Moscow, Leninskiy pr. 4
** e-mail: akaryagina@gmail.com*

Dual functional implants were obtained on the basis of gellan-xanthan hydrogel with diopside and recombinant BMP-2 and lysostaphin, the kinetics of protein release from which corresponds to the given parameters: for *Staphylococcus aureus* elimination the release of lysostaphin occurs in the first hours after implantation, the release of BMP-2 occurs gradually during at least two weeks.

Keywords: BMP-2, lysostaphin, implants, hydrogels, *Staphylococcus aureus*.

To prevent the development of infection during surgical treatment of bone tissue pathologies and/or the use of one-stage treatment of infected bone tissue defects, the development of new-generation osteoplastic materials with both osteogenic and antibacterial activity is promising. The main pathogen causing osteomyelitis is *Staphylococcus aureus*. Recently, methicillin-resistant (MRSA) strains of *S. aureus* have become widespread, which makes it difficult to treat staphylococcal infection using standard antibiotic therapy. Enzyme preparations acting on the bacterial wall, in particular lysostaphin from *S. simulans*, may be a universal tool to eliminate any strain of *S. aureus*. The aim of the study was to develop bifunctional hybrid implants with antibacterial and osteoinductive effect simultaneously, due to the presence of recombinant proteins lysostaphin and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), the main protein factor of bone tissue growth and regeneration. It was important to achieve the specified parameters of protein release kinetics: the massive release of lysostaphin should occur in the first hours after implantation to eliminate the infection, while the release of BMP-2 should occur gradually for at least two weeks to provide osteogenesis. The resulting hybrid implants were prepared based on gellan-xanthan hydrogel containing diopside calcium-magnesium silicate ceramic powder. Diopside was loaded with recombinant BMP-2 (a very high adsorption capacity of diopside (more than 150 μg/mg) towards BMP-2 has been previously shown [1]). Recombinant lysostaphin obtained according to our developed methodology [2] was introduced directly into the mixture of gellan gum and xanthan gum during the formation of hydrogels. The hydrogels were lyophilized and subjected to SEM, FTIR spectroscopy, swelling, and protein release kinetics by ELISA. Diopside was uniformly distributed, porosity was 60%, and the shape and size of pores were similar to those of native tubular bone. Swelling of dried hydrogels in PBS was very fast and occurred during the first 5-10 min. After 60 min the degree of swelling did not change and was about 20% for hydrogels without diopside and 10% for hydrogels with 0.5 – 3% diopside. The kinetics of protein release corresponded to the desired parameters - the major portion of lysostaphin was released during the first 24 hours, while BMP-2 was gradually released during two weeks of the experiment. Thus, the obtained implants have the desired properties and are promising for further *in vitro* and *in vivo* studies.

The work was financially supported by Russian Science Foundation grant 22-15-00216.

УДК 57.016 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-19-20

БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГИБРИДНЫЕ ИМПЛАНТАТЫ НА ОСНОВЕ ГЕЛЛАН-КСАНТАНОВОГО ГИДРОГЕЛЯ С ДИОПСИДОМ И РЕКОМБИНАНТНЫМИ BMP-2 И ЛИЗОСТАФИНОМ: 2. БИОСОВМЕСТИМОСТЬ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ IN VITRO

Карягина А.С.[1,2,3], Кудан Е.В.[4], Кудинова А.Г.[1], Гришин А.В.[1,3], Грунина Т.М.[1,3], Даценко В.П.[1], Жулина А.В.[1], Громова М.С.[1], Булыгина И.Н.[1,4], Сенатов Ф.С.[1,4], Лунин В.Г.[1,3], Громов А.В.[1]

[1] Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18
[2] НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40
[3] Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42
[4] Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», Россия 119049, Москва, Ленинский пр-т, д. 4, стр. 1
** e-mail: akaryagina@gmail.com*

Гибридные имплантаты, полученные на основе геллан-ксантанового гидрогеля с диопсидом и рекомбинантными BMP-2 и лизостафином, в экспериментах *in vitro* продемонстрировали высокую биосовместимость, антибактериальную и антибиоплёночную активность в отношении золотистого стафилококка.

Ключевые слова: BMP-2, лизостафин, имплантаты, гидрогели, золотистый стафилококк, биосовместимость, антибактериальная активность

Разработка новых остеопластических материалов, обладающих одновременно остеогенными и антибактериальными свойствами, представляется перспективной задачей. На основе гелланової и ксантановой камедей и порошка кальций-магниевой силикатной керамики диопсида в качестве носителя остеоиндуктивного компонента – рекомбинантного белка BMP-2, были получены образцы гибридных имплантатов, в которые также, непосредственно в основу гидрогелей, вводился рекомбинантный лизостафин из *Staphylococcus simulans*. Лизостафин – бактериальный лизин, пептидаза, гидролизующая пентаглициновые мостики пептидогликана клеточной стенки *S. aureus*. Целью исследования была оценка биосовместимости и антибактериальной активности полученных имплантатов *in vitro*. Оценка цитотоксичности образцов проводилась на основе экстрактов из образцов гидрогелей. Исследовались геллан-ксантановые гидрогели, гидрогели с диопсидом, гидрогели с диопсидом и BMP-2, гидрогели с диопсидом, BMP-2 и лизостафином. Во всех случаях экстракты оказывали незначительное токсическое действие на клетки C2C12 и NIH3T3 – после 72 часов инкубации более 87% клеток оставались жизнеспособными. Для оценки цитосовместимости клетки помещали на образцы гидрогелей, культивировали в течение нескольких дней, после чего проводили анализ морфологии клеток методом флуоресцентной микроскопии. В присутствии белков клетки имели преимущественно уплощенную, распластанную форму, в то время как на образцах без белков или без белков и диопсида наблюдалось образование округлых агрегатов из клеток. То есть образцы гибридных имплантатов имеют низкую адгезионную способность, а добавление белков способствует прикреплению и распластыванию клеток. Влияние экстрактов из образцов имплантатов на способность клеток к миграции исследовали по анализу распластывания сфероидов. 3D-сфероиды – искусственно полученные плотно упакованные сферические агрегаты клеток, которые в значительной степени имитируют микроокружение клеток в тканях *in vivo* и, таким образом, позволяют получить более надежные данные по сравнению с 2D-монослоем. Было показано, что все образцы гидрогелей способствовали миграции клеток из сфероидов, причём, добавление белков в гидрогели делало этот эффект более выраженным. Антибактериальная активность лизостафина, экстрагированного из образцов имплантатов за определённые промежутки времени оценивалась по зонам лизиса бактерий на чашках Петри. В экспериментах использовали штамм *S. aureus* ATCC 29213. Антибактериальный эффект наблюдался в случае экстрактов, отобранных через 1 и 3 часа инкубации с имплантатами, что хорошо соответствует данным по кинетике выхода лизостафина, измеренной по ИФА. Исследуемые импланты с лизостафином и BMP-2 полностью подавляли видимый рост *S. aureus* в жидкой культуре с плотностью 10^6 клеток/мл. Антибиоплёночный эффект исследовали на биоплёнках,

выращенных в течение 24-х часов в 24-х луночных планшетах со вставками (SPLInsert 24-well, 3.0 μm pore size, SPL, Korea), в которые помещали имплантат. Инкубация имплантатов с биопленкой в течение 3 часов приводила к полному разрушению биопленки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 22-15-00216.

UDC 57.016 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-19-20

DUAL FUNCTIONAL HYBRID IMPLANTS BASED ON GELLAN-XANTHAN HYDROGEL WITH DIOPSIDE, RECOMBINANT BMP-2 AND LYSOSTAPHIN: 2. BIOCOMPATIBILITY AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY IN VITRO

A.S. Karyagina[1,2,3], E.V. Koudan[4], A.G. Kudinova[1], A.V. Grishin[1,3], T.M. Grunina[1,3], B.P. Datsenko[1], A.V. Zhulina[1], M.S. Gromova[1], I.N. Bulygina[1,4], F.S. Senatov[1,4], V.G. Lunin[1,3], A.V. Gromov[1]

[1] Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098 Russia, Moscow, Gamaleya str., 18
[2] Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119992 Russia, Moscow, Leninskie gory, 1
[3] All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Sciences, 127550 Russia, Moscow, Timiryazevskaya str., 42
[4] National University of Science and Technology "MISIS", 119049 Russia, Moscow, Leninskiy pr. 4

Hybrid implants based on gellan-xanthan hydrogel with diopside and recombinant BMP-2 and lysostaphin have demonstrated high biocompatibility, antibacterial and antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* in the experiments *in vitro*.

Keywords: BMP-2, lysostaphin, implants, hydrogels, *Staphylococcus aureus*, biocompatibility, antibacterial activity

The development of new osteoplastic materials with simultaneous osteogenic and antibacterial properties is a promising approach. Hybrid implants based on gellan and xanthan gum with calcium-magnesium silicate ceramic diopside powder as a carrier of osteoinductive component – recombinant protein BMP-2, were prepared. Furthermore, recombinant lysostaphin from *Staphylococcus simulans* was introduced directly in the hydrogel. Lysostaphin is a bacterial lysin, a peptidase that hydrolyzes the pentaglycine bridges of the peptidoglycan of the cell wall of *S. aureus*. The aim of the study was to evaluate the biocompatibility and antibacterial activity of the obtained implants *in vitro*. The cytotoxicity of the hydrogel samples was assessed using an extract-based assay. Gellan-xanthan hydrogels, hydrogels with diopside, hydrogels with diopside and BMP-2, hydrogels with diopside, BMP-2 and lysostaphin were investigated. In all cases, the extracts had negligible toxic effects on C2C12 and NIH3T3 cells, with more than 87% of cells remaining viable after 72 hours of incubation. To assess cytocompatibility, cells were placed on hydrogel samples, cultured for several days, and then cell morphology was analyzed by fluorescence microscopy. In the presence of proteins, the cells had predominantly a flattened, spreading shape, while on samples without proteins or without proteins and diopside, the formation of rounded aggregates of cells was observed. This means that the hybrid implant samples have low adhesion capacity and the addition of proteins promotes cell attachment and spreading. The effect of extracts from the implant samples on the migration ability of cells was investigated by analyzing spheroid spreading patterns. 3D spheroids are artificially produced densely packed spherical aggregates of cells that largely mimic the microenvironment of cells in tissues *in vivo* and thus provide more reliable data compared to 2D monolayers. All hydrogel samples were shown to promote cell migration from the spheroids, and the addition of proteins to the hydrogels made this effect more pronounced. Antibacterial activity of lysostaphin extracted from the implants for different amount of time was evaluated by bacterial lysis zones on Petri dishes. *S. aureus* strain ATCC 29213 was used in the experiments. The antibacterial effect was observed in the case of extracts sampled after 1 and 3 hours of incubation with the implants, which corresponds well with the data on lysostaphin release kinetics measured by ELISA. The investigated implants with lysostaphin and BMP-2 completely inhibited the visible growth of *S. aureus* in liquid culture at a density of 10^6 cells/mL. The antibiofilm effect was investigated on biofilms grown for 24 hours in 24-well plates with inserts (SPLInsert 24-well, 3.0 μm pore size, SPL, Korea) in which the implant was placed. Incubation of implants with biofilm for 3 hours resulted in complete destruction of biofilm.

The work was financially supported by Russian Science Foundation grant 22-15-00216.

УДК 57.016 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-21-23

БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГИБРИДНЫЕ ИМПЛАНТАТЫ НА ОСНОВЕ ГЕЛЛАН-КСАНТАНОВОГО ГИДРОГЕЛЯ С ДИОПСИДОМ И РЕКОМБИНАНТНЫМИ BMP-2 И ЛИЗОСТАФИНОМ: 3. РЕПАРАЦИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ НА ФОНЕ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Карягина А.С.[1,2,3], Орлова П.А.[1], Жулина А.В.[1], Кривозубов М.С.[1], Грунина Т.М.[1,3], Кудинова А.Г.[1], Гришин А.В.[1,3], Даценко В.П.[1], Зайцева С.В.[1,4], Струкова Н.В.[1], Генералова М.С.[1], Рязанова А.В.[1], Громова М.С.[1], Булыгина И.Н.[1,4], Манских В.Н.[2], Сенатов Ф.С.[1,4], Лунин В.Г.[1,3], Громов А.В.[1]

[1] Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18
[2] НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40
[3] Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42
[4] Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», Россия 119049, Москва, Ленинский пр-т, д. 4, стр. 1
** e-mail: akaryagina@gmail.com*

При введении в краниальные дефекты критического размера у мышей гибридных имплантатов, полученных на основе геллан-ксантанового гидрогеля с диопсидом и рекомбинантными BMP-2 и лизостафином, наблюдался эффективный репаративный остеогенез на фоне стафилококковой инфекции.

Ключевые слова: BMP-2, лизостафин, имплантаты, гидрогели, золотистый стафилококк, репаративный остеогенез

Остеопластические материалы, обладающие одновременно остеогенными и антибактериальными свойствами, могут найти практическое применение при лечении инфекций костной ткани. На основе геллан-ксантанового гидрогеля с введённым в него порошком кальций-магниевой силикатной керамики диопсида и рекомбинантными белками BMP-2 (костный морфогенетический белок-2) и лизостафином получены гибридные имплантаты, представляющие собой лиофилизированные пористые диски диаметром 4 мм, высотой 1 мм. Способность таких имплантатов индуцировать остеогенез на фоне стафилококковой инфекции изучена на модели имплантации в краниальные дефекты критического размера у мышей. Эксперимент проводили в течение 4 недель на 36 самцах аутбредных мышей линии ICR (CD-1), по 18 животных в группе. Имплантаты первой группы содержали BMP-2, второй – BMP-2 и лизостафин. Во время имплантации 12 животным каждой группы перед установкой имплантата в дефект черепа вводили суспензию *S. aureus*, содержащей ~ 5×10^6 бактериальных клеток. Через 4 недели животных эвтаназировали. Образцы области имплантации 6 неинфицированных и 6 инфицированных животных каждой группы подвергали микроКТ и последующему гистологическому анализу. Образцы области имплантации и ткани мозга из оставшихся 6 инфицированных животных каждой группы гомогенизировали и проводили высевы на чашки Петри с питательной средой для оценки уровня инфицированности. Из 6 инфицированных животных группы с BMP-2 одно погибло на сроке 3 недель, в образцах области имплантации и мозга ещё одного животного обнаружилось соответственно 5×10^3 и 2×10^4 КОЕ/мг *S. aureus*. У остальных 4 животных инфекция элиминировалась самопроизвольно, что было ожидаемо из-за сильно выраженной иммунной реакции в отношении патогенной микрофлоры у грызунов. В группе с BMP-2 и лизостафином инфекции не было выявлено ни у одного из 6 животных. МикроКТ выявила практически полную минерализацию области дефекта в группе с BMP-2 и в группе с BMP-2 и лизостафином. Инфицирование дефекта в группе с BMP-2 и лизостафином не привело к снижению уровня минерализации образцов. При этом в группе с BMP-2 без лизостафина введение в дефект стафилококка приводило к полной отсутствии минерализации по данным микроКТ через 4 недели после имплантации. При гистологическом анализе в группах с BMP-2, BMP-2 и лизостафином, а также BMP-2 и лизостафином с инфицированием наблюдается примерно одинаковая картина репаративного остеогенеза: зарастание дефекта молодой костной тканью с множественными очагами костного мозга в межтрабекулярном пространстве. В группе BMP-2 с лизостафином в образцах с инфицированием отмечается слабо выраженная воспалительная реакция.

В группе BMP-2 с инфицированием в части образцов в области имплантации наблюдается образование фиброзной мембраны с диффузным воспалительным инфильтратом, а в части – с обширными очагами гнойного воспаления. Таким образом, полученные гибридные имплантаты обеспечивают возможность эффективного репаративного остеогенеза на фоне стафилококковой инфекции.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 22-15-00216.

UDC 57.016 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-21-23

DUAL FUNCTIONAL HYBRID IMPLANTS BASED ON GELLAN-XANTHAN HYDROGEL WITH DIOPSIDE, RECOMBINANT BMP-2 AND LYSOSTAPHIN: 3. BONE DEFECT REPARATION AMID STAPHYLOCOCCUS AUREUS INFECTION

A.S. Karyagina[1,2,3], P.A. Orlova[1], A.V. Zhulina[1], M.S. Krivozubov[1], T.M. Grunina[1,3], A.G. Kudinova[1], A.V. Grishin[1,3], B.P. Datsenko[1], S.V. Zaitseva[1,4], N.V. Strukova[1], M.S. Generalova[1], A.V. Ryazanova[1], M.S. Gromova[1], I.N. Bulygina[1,4], V.N. Manskikh[2], F.S. Senatov[1,4], V.G. Lunin[1,3], A.V. Gromov[1]

[1] Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098 Russia, Moscow, Gamaleya str., 18
[2] Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119992 Russia, Moscow, Leninskie gory, 1
[3] All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Sciences, 127550 Russia, Moscow, Timiryazevskaya str., 42
[4] National University of Science and Technology "MISIS", 119049 Russia, Moscow, Leninskiy pr. 4
** e-mail: akaryagina@gmail.com*

Effective reparative osteogenesis was observed in mice with the introduction of hybrid implants based on gellan-xanthan hydrogel with diopside, recombinant BMP-2 and lysostaphin into cranial defects of critical size accompanied by staphylococcal infection.

Keywords: BMP-2, lysostaphin, implants, hydrogels, Staphylococcus aureus, reparative osteogenesis

Osteoplastic materials with simultaneous osteogenic and antibacterial properties can be applied in the treatment of bone tissue infections. Hybrid implants, which are lyophilized porous disks with diameter of 4 mm and height of 1 mm, were prepared based on gellan-xanthan hydrogel with calcium-magnesium silicate ceramic diopside powder and recombinant proteins BMP-2 (bone morphogenetic protein-2) and lysostaphin. The ability of such implants to induce osteogenesis when implantation is accompanied by staphylococcal infection was studied on the model of cranial defects of critical size in mice. The experiment was carried out for 4 weeks on 36 male outbred mice of ICR (CD-1) line, 18 animals per group. Implants from the first group contained BMP-2, while the implants from second group contained both BMP-2 and lysostaphin. During implantation, 12 animals of each group were injected with a suspension of *S. aureus* containing ~5×10^6 bacterial cells into the skull defect before implantation. After 4 weeks, the animals were euthanized. Samples from the implantation area of 6 uninfected and 6 infected animals of each group were subjected to μCT and subsequent histologic analysis. Samples of the implantation area and brain tissue from the remaining 6 infected animals of each group were homogenized and plated on Petri dishes with nutrient medium to assess the level of infection. Of the 6 infected animals in the group with BMP-2, one died at 3 weeks, and samples from the implantation area and brain of another animal contained 5×10^3 and 2×10^4 CFU/mg of *S. aureus*, respectively. In the remaining 4 animals, the infection eliminated spontaneously, which could be expected because of the strong immune response against pathogenic microflora in rodents. In the group with BMP-2 and lysostaphin, no infection was detected in any of the 6 animals. μCT revealed almost complete mineralization of the defect area in the group with BMP-2 and in the group with BMP-2 and lysostaphin. Infection of the defect in the group with BMP-2 and lysostaphin did not reduce the mineralization of the specimens. At the same time, the introduction of *S. aureus* into the defect in the group with BMP-2 without lysostaphin resulted in complete absence of mineralization according to μCT data 4 weeks after implantation. The histological analysis of the groups with BMP-2, BMP-2 and lysostaphin, as well as BMP-2 and lysostaphin with infection demonstrated effectively the same picture of reparative osteogenesis: overgrowth of the defect with juvenile bone tissue with multiple foci of bone marrow in the intertrabecular space. In the BMP-2 group with lysostaphin, a minimal inflammatory reaction was observed in the samples with infection. In the BMP-2 group

with infection there was a formation of fibrous membrane with diffuse inflammatory infiltrate in the implantation area in part of the samples, while the other part contained extensive foci of purulent inflammation. Thus, the obtained hybrid implants provide an effective reparative osteogenesis when implantation is accompanied by staphylococcal infection.

The work was financially supported by Russian Science Foundation grant 22-15-00216.

УДК 606:61 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-23-25

IN VITRO ИССЛЕДОВАНИЕ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСНЫХ КОНСТРУКЦИЙ С ГЕНОМ BMP-2, ПОЛИЛАКТИДНЫХ ГРАНУЛ, КОЛЛАГЕН И ФИБРИНА.

Мокроусова В.О.[1,2], Недорубова И.А.[1], Меглей А.Ю.[1,2], Басина В.П.[1], Васильев А.В.[2], Гольдштейн Д.В.[1], Бухарова Т.Б.[1]

[1] ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», 115478, Москва, ул. Москворечье, 1
[2] ФГБУ НМИЦ "ЦНИИСиЧЛХ" Минздрава России, 119021, Москва, ул. Тимура Фрунзе, 16 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1
e-mail: victoria-mok@yandex.ru

Созданы ген-активированные матриксы, состоящие из полилактидных гранул, коллагена и фибрина, импрегнированные аденовирусными конструкциями с геном *BMP2* или *GFP* и показана их цитосовместимость *in vitro*. Аденовирусные конструкции, импрегнированные в матриксы, обладают высокой трансдуцирующей способностью и остеоиндуктивной активностью на культуре ММСК ЖТ.

Ключевые слова: ген-активированные матриксы, коллаген, пористые полилактидные гранулы (PLA), PRP, аденовирусные конструкции, BMP2.

В настоящее время создание новых ген-активированных матриксов, содержащих гены остеоиндукторов, играет важную роль в решении проблемы восстановления костной ткани. Наиболее эффективным способом доставки генов в клетки является применение аденовирусных векторов, которые обеспечивают высокую эффективность трансдукции как делящихся, так и неделящихся клеток, и сводят к минимуму риск возникновения инсерционного мутагенеза. Активное внедрение вакцин на основе аденовирусов против ковида показало способность данных конструкций обеспечивать продукцию целевых белков на высоком уровне у огромной популяции пациентов. В качестве целевого гена для регенерации костной ткани перспективно использование гена костного морфогенетического белка 2 (*BMP2*), продукт которого является эффективным остеоиндуктором. В качестве матрикса может быть использована композиция из биорезорбируемых биосовместимых материалов - пористых полилактидных гранул, коллагена и фибринового сгустка на основе обогащенной тромбоцитами плазмы (PRP). PLA-гранулы служат депо для доставки биоактивных компонентов, а коллаген и PRP позволяют сохранять форму материала в течение нескольких недель и являются источниками факторов, участвующих в регенерации костной ткани.

Цель работы: исследование свойств ген-активированных матриксов на основе PLA-гранул, коллагена и PRP, импрегнированных аденовирусными конструкциями с геном *BMP-2*.

Материалы и методы. Цитосовместимость матриксов PLA/Col/PRP, импрегнированных Ad-BMP2, проверяли при инкубации с культурами ММСК ЖТ. Оценку жизнеспособности клеток проводили после 1 и 7 суток инкубации методом MTT-теста и с помощью флуоресцентной микроскопии: все клетки были окрашены PKH-26, живые клетки – кальцеином AM, а мертвые клетки – DAPI. Адгезию клеток на поверхности матриксов оценивали методом сканирующей электронной микроскопии. Оценку эффективности трансдукции клеточных культур аденовирусными конструкциями с геном *GFP*, импрегнированными в матриксы, проверяли с помощью флуоресцентной микроскопии, а аденовирусных конструкций с геном *BMP2* по экспрессии целевого гена и продукции белка BMP-2. Для исследования остеогенных свойств матриксов Col/PLA/PRP-Ad-BMP2 на 14-й день методом ПЦР-РВ оценили экспрессию генов и продукцию щелочной фосфатазы (Alpl) и остеопонтина (Spp1) методом иммуноферментного анализа. Также было проведено окрашивание ализариновым красным для обнаружения минерализованного внеклеточного матрикса (ВКМ) ММСК ЖТ.

Результаты. В ходе *in vitro* исследований матриксы Col/PLA/PRP, импрегнированные Ad-BMP2 показали высокую цитосовместимость с ММСК ЖТ. Согласно результатам МТТ-теста, было выявлено 105,9±5,1% жизнеспособных клеток от контрольной группы. Также наблюдалась эффективная клеточная адгезия на поверхности матриксов. Было показано, что как Ad-GFP, так и Ad-BMP2, импрегнированные в матриксы PLA/Col/PRP, высвобождаются из матриксов и эффективно трансдуцируют ММСК ЖТ. В клетках, культивируемых в присутствии матриксов PLA/Col/PRP-Ad-BMP2, на 14 сутки наблюдалось увеличение уровня экспрессия гена *BMP2* в 6,3±1,0 раз по сравнению с клетками с PLA/Col/PRP и увеличение продукции белка BMP-2 до 488±2 пг/мл. Инкубация ММСК ЖТ с PLA/Col/PRP-Ad-BMP2 способствует остеогенной дифференцировке клеток. Было показано увеличение экспрессии генов *Alpl* в 5,6±0,8 раз и *Spp1* в 16,8±0,6 раз. А также в клетках наблюдалось увеличение продукции белка Alpl в 4,6±0,6 раз и Opn в 10,4±1,2 раза по сравнению с клетками в присутствие PLA/Col/PRP. Кроме того, было обнаружено увеличение активности щелочной фосфатазы в 3,2±0,1 раз по сравнению с неактивированным матриксом и наблюдалась минерализация ВКМ ММСК ЖТ.

Результаты исследования показали, что матриксы Col/PLA/PRP, активированные аденовирусными конструкциями с геном *BMP2*, обладают высокой цитосовместимостью и проявляют выраженные остеоиндуктивные свойства *in vitro*, что определяет их высокий потенциал использования в регенеративной медицине для лечения дефектов костной ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 21-75-10147.

UDC 606:61 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-23-25

IN VITRO STUDY OF MATRICES BASED ON ADENOVIRAL CONSTRUCTS WITH THE BMP-2 GENE, POLYLACTIDE GRANULES, COLLAGEN AND FIBRIN

V.O. Mokrousova[1,2], I.A. Nedorubova[1], A.YU. Meglei[1,2], V.P. Basina[1], A.V. Vasilyev[1,2], D.V. Goldstein[1], T.B. Bukharova[1]

[1] Research Centre for Medical Genetics, 1, Moskvorechye str., Moscow, 115478, Russian Federation
[2] Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery, 16, Timura Frunze str., Moscow, 119021, Russian Federation
115478, Moscow, Moskvorechye, 1
e-mail: victoria-mok@yandex.ru

Gene-activated matrices were created, consisting of polylactide granules, collagen and fibrin, impregnated with adenoviral constructs with the *BMP2* or *GFP* gene, and their cytocompatibility *in vitro* was shown. Adenovirus constructs impregnated into matrices have a high transducing ability and osteoinductive activity on the adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AT-MSCs).

Keywords: gene-activated matrices, collagen, porous polylactide granules (PLA), PRP, adenoviral constructs, BMP2.

At present, the creation of new gene-activated matrices containing osteoinductor genes plays an important role in solving the problem of bone regeneration. The most efficient way to deliver genes to cells is to use adenoviral vectors, which provide high transduction efficiency for both proliferating and non-proliferating cells and minimize the risk of insertional mutagenesis. The active introduction of vaccines based on adenoviruses against COVID-19 has shown the ability of these constructs to ensure the production of target proteins at a high level in a huge population of patients. The bone morphogenetic protein 2 (*BMP2*) gene, the product of which is an effective osteoinducer, is promising as a target gene for bone regeneration. As matrices, a composition of bioresorbable biocompatible materials - porous polylactide granules, collagen and fibrin clot based on platelet-rich plasma (PRP) can be used. PLA granules serve as a depot for the delivery of bioactive components, while collagen and PRP allow the material to retain its shape for several weeks and are sources of factors involved in bone regeneration.

The aim of this work is to study the properties of gene-activated matrices based on PLA-granules, collagen and PRP, impregnated with adenoviral constructs with the *BMP2* gene.

Materials and methods. Cytocompatibility of PLA/Col/PRP matrices impregnated with Ad-BMP2 was tested during incubation with AT-MSCs. Cell viability was assessed after 1 and 7 days of incubation by the MTT test and fluorescence microscopy: all cells were stained with PKH-26, live cells were stained with calcein AM, and dead

cells were stained with DAPI. Cell adhesion on the matrix surface was assessed by scanning electron microscopy. Evaluation of the efficiency of transduction of cells by adenoviral constructs with the *GFP* gene impregnated into matrices was checked using fluorescent microscopy, and of adenoviral constructs with the *BMP2* gene by expression of the target gene and production of the BMP-2 protein. To study the osteogenic properties of Col/PLA/PRP-Ad-BMP2 matrices on day 14, RT-PCR was used to evaluate gene expression and production of alkaline phosphatase (Alpl) and osteopontin (Spp1) by enzyme immunoassay. Alizarin red staining was also performed to detect extracellular matrix mineralization (ECM) of AT-MSCs.

Results. In the course of *in vitro* studies, Col/PLA/PRP matrices impregnated with Ad-BMP2 showed high cytocompatibility with AT-MSCs. According to the results of the MTT test, 105,9±5,1% of viable cells from the control group were detected. Efficient cell adhesion to the surface of the matrices was also observed. It was shown that both Ad-GFP and Ad-BMP2 impregnated into PLA/Col/PRP matrices are released from the matrices and effectively transduce AT-MSCs. In cells in the presence of PLA/Col/PRP-Ad-BMP2 matrices, on day 14, an increase in the expression level of the *BMP2* gene by 6,3±1,0 times was observed compared to cells with PLA/Col/PRP and an increase in protein production BMP-2 to 488±2 pg/ml. Incubation of AT-MSCs with PLA/Col/PRP-Ad-BMP2 promotes osteogenic cell differentiation. An increase in the expression of *Alpl* genes by 5,6±0,8 times and *Spp1* by 16,8±0,6 times was shown. Also, the cells showed an increase in the production of Alpl protein by 4,6 ± 0,6 times and Opn by 10,4 ± 1,2 times compared with cells in the presence of PLA/Col/PRP. In addition, an increase in the activity of alkaline phosphatase by 3,2 ± 0,1 times compared with the non-activated matrix was found, and ECM mineralization of AT-MSCs was observed.

The results of the study showed that Col/PLA/PRP matrices activated by adenoviral constructs with the BMP2 gene have high cytocompatibility and exhibit pronounced osteoinductive properties *in vitro*, which determines their high potential for use in regenerative medicine for the treatment of bone defects.

This work was supported by the Russian Science Foundation, grant № 21-75-10147.

УДК 577.15 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-25-27

ОЦЕНКА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ С, ПОЛУЧЕННОЙ В СИСТЕМЕ BACILLUS MOJAVENSIS

Чиркова В.Ю., Щербаков Д.Н., Шарлаева Е.А., Ширманов М.В., Колосов П.В., Колосова Е.А., Иркитова А.Н., Малкова А.В., Дудник Д.Е., Каргашилова Е.Н., Евдокимов И.Ю.

Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия
656049, Барнаул, пр. Ленина, д. 61
e-mail: varvara.chirkova@gmail.com

Получен ферментный препарат рекомбинантной фосфолипазы С в системе *Bacillus mojavensis*. Проведен подбор питательной среды и условий культивирования. Определены суточная динамика изменения активности и температурный оптимум фермента, а также оптимальное время опытно-промышленной наработки в 250-литровом биореакторе.

Ключевые слова: фосфолипазы; рекомбинантные ферменты; культивирование; ферментация; активность.

Фосфолипаза С (PLC, КФ 3.1.4.3), катализирующая реакции гидролитического расщепления связей в фосфолипидах, имеет широкое практическое применение [1]. Поскольку российских препаратов PLC на рынке нет, их разработка и оптимизация условий промышленного получения является актуальной задачей биотехнологии.

С использованием рекомбинантного штамма *B. mojavensis* BDV-1/PLC6H, полученного электропорацией плазмидой pBSU-PLC6H штамма реципиента *B. mojavensis* BDV-1, был наработан ферментный препарат PLC. Культивирование производилось в 15 л биореакторе (ООО «Сторге», Россия). В результате исследования по подбору питательной среды для культивирования, была выбрана ферментационная среда следующего состава (г/л): меласса – 25, кукурузный экстракт – 12,5, дрожжевой экстракт – 1, пептон – 0,5, $MgSO_4$ – 0,25, $MnSO_4$ – 0,03, $CoCl_2$ – 0,046, $CaCl_2$ – 1, софэксил – 0,5, вода водопроводная – до 1 л, pH = 6,8–7,0. Продолжительность и температура культивирования – 24 ч при 37 °C. Во время ферментации отбирали пробы для анализа активности фермента, которую определяли спектрофотометрическим методом с использованием синтетического субстрата п-нитрофенилфосфорилхолина [2], а также для определения температурного оптимума.

Отбор проб с интервалом 1 час на протяжении 24-х часов позволил определить суточную динамику изменения активности рекомбинантного фермента. Максимальная активность зафиксирована при 8 часовом культивировании (А=307,4 ед.акт/мл), дальнейшее увеличение продолжительности наработки приводило к снижению активности полученного фермента. Температурный оптимум действия фермента составил 60 °С.

При опытно-промышленном масштабировании с использованием 250-литрового биореактора (ООО «Сторге», Россия) оптимальное время наработки PLC оставило 13 часов (А=248,2 ед.акт./мл), т.к. дальнейшее увеличение продолжительности культивирования не привело к росту активности. Проверка спустя два и четыре месяца хранения при температуре +4 °С показала, что ферментный препарат не потерял свою активность.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Управления Алтайского края по пищевой, перерабатывающей, фармацевтической промышленности и биотехнологиям.

Литература:

1. *Merkulyeva Y.A., Shcherbakov D.N., Sharlaeva E.A., Chirkova V.Y. Phospholipases c from the genus Bacillus: biological role, properties, and fields of application // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2021. – T. 47. № 3. P. 653–659.*
2. *Kurioka S., Matsuda M. Phospholipase C assay using p-Nitrophenylphosphorylcholine together with sorbitol and its application to studying the metal and detergent requirement of the enzyme // Anal. Biochem. – 1976. – V. 75. № 1. – P. 281–289.*

UDC 577.15 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-25-27

EVALUATION OF THE ENZYMATIC ACTIVITY OF RECOMBINANT PHOSPHOLIPASE C PRODUCED IN THE BACILLUS MOJAVENSIS SYSTEM

V.Yu. Chirkova, D.N. Shcherbakov, E.A. Sharlaeva, M.V. Shirmanov, P.V. Kolosov, E.A. Kolosova, A.N. Irkitova, A.V. Malkova, D.E. Dudnik, E.N. Kargashilova, I.Yu. Evdokimov

Altai State University, Barnaul, Russia
656049, Barnaul, Lenin pr., 61
e-mail: varvara.chirkova@gmail.com

An enzyme preparation of recombinant phospholipase C was obtained in the *Bacillus mojavensis* system. Selection of nutrient medium and cultivation conditions was carried out. The daily dynamics of changes in activity and the temperature optimum of the enzyme, as well as the optimal time for pilot-industrial production in a 250-liter bioreactor, were determined.

Key words: phospholipases; recombinant enzymes; cultivation; fermentation; activity.

Phospholipase C (PLC, EC 3.1.4.3), which catalyzes the reactions of hydrolytic bond cleavage in phospholipids, has a wide practical application [1]. Since there are no Russian PLC preparations on the market, their development and optimization of industrial production conditions is an urgent task of biotechnology.

Using the recombinant strain *B. mojavensis* BDV-1/PLC6H obtained by electroporation with the plasmid pBSU-PLC6H of the recipient strain *B. mojavensis* BDV-1, a PLC enzyme preparation was obtained. Cultivation was carried out in a 15 L bioreactor (OOO Storge, Russia). As a result of a study on the selection of a nutrient medium for cultivation, a fermentation medium of the following composition (g/l) was chosen: molasses – 25, corn extract – 12,5, yeast extract – 1, peptone – 0,5, $MgSO_4$ – 0,25, $MnSO_4$ – 0,03, $CoCl_2$ – 0,046, $CaCl_2$ – 1, sofexil – 0,5, tap water – up to 1 L, pH = 6,8–7,0. The cultivation time and temperature were 24 h at 37 °C. During fermentation, samples were taken to analyze the activity of the enzyme, which was determined by the spectrophotometric method using the synthetic substrate p-nitrophenylphosphorylcholine [2], as well as to determine the temperature optimum.

Sampling at intervals of 1 hour for 24 hours made it possible to determine the daily dynamics of changes in the activity of the recombinant enzyme. The maximum activity was recorded at 8 hours of cultivation (A=307,4 U/ml), a further increase in the duration of production led to a decrease in the activity of the resulting enzyme. The temperature optimum for the action of the enzyme was 60°C.

During pilot scale-up using a 250-liter bioreactor (OOO Storge, Russia), the optimal PLC operating time was 13 hours (A = 248,2 U/ml), because a further increase in the duration of cultivation did not lead to an increase in activity. A check after two and four months of storage at a temperature of +4 °C showed that the enzyme preparation had not lost its activity.

The work was supported by a grant from the Altai Territory Administration for Food, Processing, Pharmaceutical Industry and Biotechnology.

References:

1. *Merkulyeva Y.A., Shcherbakov D.N., Sharlaeva E.A., Chirkova V.Y. Phospholipases c from the genus Bacillus: biological role, properties, and fields of application // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2021. – T. 47. № 3. P. 653–659.*
2. *Kurioka S., Matsuda M. Phospholipase C assay using p-Nitrophenylphosphorylcholine together with sorbitol and its application to studying the metal and detergent requirement of the enzyme // Anal. Biochem. – 1976. – V. 75. № 1. – P. 281–289.*

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ И ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ МИКРОРНК

EXTRACELLULAR VESICLES AND CIRCULATING MICRORNA

1. ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ НА МОДЕЛИ ГЛУТАМАТНОЙ ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТИ
Шеденкова М.О., Некрасова А.А., Салихова Д.И., Бакаева З.В., Сурин А.М., Гольдштейн Д.В. 30

STUDY OF NEUROPROTECTIVE ACTION OF EXTRACELLULAR VESICLES SECRETED BY GLIAL PROGENITOR CELLS IN A MODEL OF GLUTAMATE EXCITOTOXICITY
M.O. Shedenkova, A.A. Nekrasova, D.I. Salikhova, Z.V. Bakaeva, A.M. Surin, D.V. Goldshtein 31

УДК 576.311.33 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-30-31

ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ НА МОДЕЛИ ГЛУТАМАТНОЙ ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТИ.

Шеденкова М.О.[1,2], Некрасова А.А.[3], Салихова Д.И.[1,2], Бакаева З.В.[3], Сурин А.М.[4], Гольдштейн Д.В.[1,2]

[1] Российский университет дружбы народов 117198, г. Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, 6
[2] ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени Н.П. Бочкова» 115522, г. Москва, Россия, ул. Москворечье, д. 1
[3] ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России 119296 г. Москва, Россия, Ломоносовский проспект, 2, стр.1
[4] ФГБНУ «НИИОПП» 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д.8
e-mail: margarita.shedenkova@gmail.com

Перспективным подходом для терапии многих неврологических заболеваний является применение внеклеточных везикул (ВВ). В данной работе исследовали нейропротективное действие ВВ, выделенных из глиальных клеток-предшественников (ВВ-ГКП) человека, на модели глутаматной эксайтотоксичности. Также был изучен их состав с помощью протеомного анализа. Было показано, что ВВ-ГКП повышают жизнеспособность кортикальных нейронов крыс в условиях глутаматной эксайтотоксичности предположительно за счет входящих в их состав белков, отвечающих за негативную регуляцию клеточной гибели.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, иПСК, глиальные клетки-предшественники, протеом, глутаматная эксайтотоксичность, нейропротекция.

На сегодняшний день поиск новых нейропротективных средств для терапии неврологических заболеваний остаётся актуальной задачей. В данном проекте предлагается использовать ВВ, выделенные из глиальных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) человека. Так как именно глиальные клетки выполняют поддерживающую и трофическую функции для нейронов [1].

Для определения нейропротективных свойств ВВ-ГКП использовали модель глутаматной эксайтотоксичности, поскольку нарушение гомеостаза глутамата является признаком ишемии и ряда сопутствующих ей патологий головного мозга [2]. Для этого получали первичную культуру кортикальных нейронов из новорожденных крысят (P0). На 10-ые сутки добавляли препараты ВВ-ГКП. На следующий день производили постановку модели глутаматной эксайтотоксичности [3]. Оценку выживаемости проводили с помощью MTT теста. Статистическая обработка данных (критерий Шапиро-Уилка и односторонний тест ANOVA) проводили в программе SigmaPlot 12.5. Протеомного анализа проводили на хроматографической системе Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific), сопряженной с масс-спектрометром Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific). Дальнейший анализ белков проводили в программе String 11.5.

В присутствии 100 мкМ глутамата наблюдали снижение числа жизнеспособных кортикальных нейронов на 37,5±4,03% по сравнению с группой контроля, которую принимали за 100%. Добавление ВВ-ГКП в концентрации 3 мкг/мл достоверно повышало выживаемость нейронов на 20%±5,56% (p=0,046), при этом концентрация 10 мкг/мл увеличивала количество жизнеспособных клеток до контрольных значений (p<0,001). Протеомным анализом были идентифицированы белки, относящиеся к негативной регуляции гибели нейронов, такие как белок 14-3-3; пероксиредоксины 1, 4, 6; белок 1, активируемый гипоксией (HYOU1), супероксид-дисмутаза 2, а также белки сигнального пути PI3K-Akt.

ВВ-ГКП обладают нейропротективными свойствами в модели глутаматной эксайтотоксичности. Полученные результаты могут быть обусловлены содержанием в везикулах белков, обладающих нейропротективным действием.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № КБК 075 0110 47 1 S7 24600 621) по теме «Разработка новых лекарственных средств для терапии неврологических заболеваний»

Литература

1. Nedergaard M., Dirnagl U. Role of glial cells in cerebral ischemia //Glia. – 2005. – Т. 50. – №. 4. – С. 281-286.

2. Lau A., Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration //Pflügers Archiv-European Journal of Physiology. – 2010. – Т. 460. – С. 525-542.

3. Салихова Д. И. и др. Сравнительный анализ влияния кондиционированных сред, полученных при культивировании нейрональных и глиальных предшественников, на мозжечковые нейроны при глутаматной эксайтотоксичности //Гены и клетки. – 2019. – Т. 14. – №. 4. – С. 46-53.

UDC 576.311.33 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-30-31

STUDY OF NEUROPROTECTIVE ACTION OF EXTRACELLULAR VESICLES SECRETED BY GLIAL PROGENITOR CELLS IN A MODEL OF GLUTAMATE EXCITOTOXICITY

M.O. Shedenkova[1,2], A.A. Nekrasova[3], D.I. Salikhova[1,2], Z.V. Bakaeva[3], A.M. Surin[4], D.V. Goldshtein[1,2]

[1] RUDN University 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya St. 6
[2] Research Centre for Medical Genetics 115522, Moscow, Moskvorechye 1.
[3] National Medical Research Center for Children's Health 119296 Moscow, Lomonosovsky Prospect, 2, build. 1
[4] Institute of general pathology and pathophysiology 125315, Moscow, Russia Baltiyskaya St. 8,

Extracellular vesicles (EVs) is a promising approach for the therapy of many neurological diseases. The neuroprotective effect of EVs isolated from human glial progenitor cells (EV-GPCs) evaluated using a model of glutamate excitotoxicity. The protein composition of EV-GPCs studied by proteomic analysis. In results, the EV-GPCs increased the viability of rat cortical neurons under glutamate excitotoxicity due to proteins responsible for negative regulation of cell death in their cargo.

Keywords: extracellular vesicles, iPSCs, glial progenitor cells, proteome, glutamate excitotoxicity, neuroprotection.

The search for new neuroprotective agents for the therapy of neurological diseases remains an urgent task. Such a new approach maybe the EVs isolated from glial progenitor cells of human induced pluripotent stem cells (iPSCs), because the glial cells provide supportive and trophic functions for neurons [1].

To determine the neuroprotective action of EV-GPCs was used a model of glutamate excitotoxicity, since the disruption of glutamate homeostasis is a sign of ischemia and various associated pathologies of the brain [2]. For this purpose, primary cultures of cortical neurons were obtained from newborn rats (P0). The EV-GPCs were added to the neurons on the 10th day, and the model of glutamate excitotoxicity was performed on the next day [3]. The survival rate was assessed using the MTT test. Statistical analysis (Shapiro-Wilk test and one-way ANOVA test) was performed using SigmaPlot 12.5 software. Proteomic analysis was carried out using an Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific) coupled with a Q Exactive HF mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific), and further bioinformatic analysis of proteins using String 11.5 software.

Incubation of cortical neurons with 100 μM glutamate led to the decreasing of number of viable cells in 37.5±4.03% compared with the control group, which was considered 100%. Addition of EV-GPCs at a concentration of 3 μg/ml significantly enhanced neuron survival by 20%±5.56% (p=0.046), while a concentration of 10 μg//ml increased the number of viable cells to control levels (p < 0.001). Proteomic analysis identified proteins associated with negative regulation of neuronal death, such as protein 14-3-3, peroxiredoxins 1, 4, 6, hypoxia-activated protein 1 (HYOU1), superoxide dismutase 2, and proteins associated with PI3K-Akt pathway.

This work financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Project No. KBK 075 0110 47 1 S7 24600 621) by "Development of New Drugs for Therapy of Neurological Diseases".

References:

1. Nedergaard M., Dirnagl U. Role of glial cells in cerebral ischemia //Glia. – 2005. – Т. 50. – №. 4. – С. 281-286.

2. Lau A., Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration //Pflügers Archiv-European Journal of Physiology. – 2010. – Т. 460. – С. 525-542.

3. Salikhova D. I. et al. Comparative analysis of conditioned medium by neuronal and glial progenitor cells on cerebellar neurons under glutamate excitotoxicity //Genes & Cells. – 2019. – Т. 14. – №. 4. – С. 46-53.

НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ

NANOBIOTECNOLOGY IN MEDICINE

1. РАЗРАБОТКА ВЕКТОРА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВЫСОКОПРОДУКТИВНОГО
СТАБИЛЬНОГО ПРОДУЦЕНТА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG
Кошелева Е.С., Воронина Е.В., Марыгин Р.А., Миронова Е.М., Клишин А.А., Николаева В.В., Серегин Ю.А. 35

DEVELOPMENT OF A VECTOR FOR CREATING A HIGHLY CONCENTRATED
STABLE PRODUCT INTENDED FOR USE AS A MONOCLONAL ANTIBODY TO THE IgG CLASS
E.S. Kosheleva, E.V. Voronina, R.A. Marygin, E.M. Mironova, A.A. Klishin, V.V. Nikolaeva, Y.A. Seregin 36

2. ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОДИАМИЧЕСКИХ ВЕЛИЧИН АКТИВИРОВАННОЙ
КУМАРИНАМИ С-314, С-334 ИЛИ С-525 ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ
ПОД ДЕЙСТВИЕМ КОМПЛЕКСА ЦИТОХРОМА С С КАРДИОЛИПИНОМ
Левченко И.Н., Владимиров Г.К. Володяев И.В. 36

INVESTIGATION OF THERMODYNAMIC VALUES OF CHEMILUMINESCENCE
ACTIVATED BY COUMARINS C-314, C-334 OR C-525
UNDER THE ACTION OF CYTOCHROME C COMPLEX WITH CARDIOLIPIN
I.N. Levchenko, G.K. Vladimirov, I.V. Volodyaev 38

3. МОДЕЛИРОВАНИЕ ТОЧЕК ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВОСТИ АКТИВИРОВАННОЙ
ПРИРОДНЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ КУМАРИНАМИ С-314 И С-525 ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ
ПОД ДЕЙСТВИЕМ КОМПЛЕКСА ЦИТОХРОМА С С КАРДИОЛИПИНОМ
Левченко И.Н., Владимиров Г.К. Володяев И.В. 39

MODELING OF POINTS OF ENZYMATIC ACTIVITY ACTIVATED
BY NATURAL DYES COUMARINS C-314 AND C-525 CHEMILUMINESCENCE
UNDER THE ACTION OF CYTOCHROME C COMPLEX WITH CARDIOLIPIN
I.N. Levchenko, G.K. Vladimirov, I.V. Volodyaev 40

4. МОДЕЛИРОВАНИЕ ТОЧЕК ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ АКТИВИРОВАННОЙ ПРИРОДНЫМИ
КРАСИТЕЛЯМИ КУМАРИНАМИ С-314, С-334.С-525 ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ
КОМПЛЕКСА ЦИТОХРОМА С С КАРДИОЛИПИНОМ КАК ГЕТЕРОГЕННОГО КАТАЛИЗАТОРА
Левченко И.Н., Владимиров Г.К. Володяев И.В. 42

MODELING OF POINTS OF ENZYMATIC ACTIVITY ACTIVATED BY NATURAL DYES
COUMARINS C-314, C-334.C-525 CHEMILUMINESCENCE UNDER THE ACTION OF CYTOCHROME C
COMPLEX WITH CARDIOLIPIN AS A HETEROGENEOUS CATALYST
I.N. Levchenko, G.K. Vladimirov, I.V. Volodyaev 43

5. ВЛИЯНИЕ АЛЛИЛПОЛИАЛКОКСИБЕНЗОЛОВ НА ОКСИДАЗНУЮ И ДЕГИДРОГЕНАЗНУЮ
АКТИВНОСТИ МЕМБРАНОТРОПНЫХ ФЕРМЕНТОВ: ГАЛАКТОНОЛАКТОНОКСИДАЗЫ
ИЗ TRYPANOSOMA CRUZI И L-ГАЛАКТОНО-,4-ЛАКТОНДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ARABIDOPSIS THALIANA
Чудин А.А., Кудряшова Е.В.....44

IMPACT OF ALLYLPOLYALKOXYBENZENES ON OXIDASE AND DEHYDROGENASE ACTIVITIES
OF MEMBRANOTROPIC ENZYMES: GALACTONOLACTON OXIDASE
FROM TRYPANOSOMA CRUZI AND L-GALACTONO-,4-LACTONE DEHYDROGENASE FROM ARABIDOPSIS THALIANA
A.A. Chudin, E.V. Kudryashova 45

6. АТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИАГРЕГАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА
НАНОЧАСТИЦ С ГЛУТАТИОНОМ И ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТОЙ
В.А. Щелконогов, А.М. Иншакова, Е.С. Дарнотук, Н.А. Суриков, А.Ю. Евстратова,
О.А. Баранова, А.В. Чеканов, К.Д. Казаринов, Н.С. Шастина, Э.Ю. Соловьева, А.И. Федин 46

ANTIOXIDANT AND ANTIPLATELET PROPERTIES OF NANOPARTICLES WITH GLUTATHIONE AND LIPOIC ACID
V.A. Shchelkonogov, A.M. Inshakova, E.S. Darnotuk, N.A. Surikov, A.Yu. Evstratova,
O.A. Baranova, A.V. Chekanov, K.D. Kazarinov, N.S. Shastina, E.Yu. Solov'eva, A.I. Fedin 48

7. ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ β-ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА САЙТ СВЯЗЫВАНИЯ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА С ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ
Якупова Л.Р., Бежанидзе Е.З., Копнова Т.Ю., Скуредина А.А., Кудряшова Е.В. 49

THE EFFECT OF β-CYCLODEXTRIN DERIVATIVES ON THE BINDING SITE AND THE EFFECTIVENESS
OF LEVOFLOXACIN INTERACTION WITH HUMAN SERUM ALBUMIN
L.R. Yakupova, E.Z. Bezhanidze, T.Yu. Kopnova, A.A. Skuredina, E.V. Kudryashova.....51

УДК 577.218 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-35-36

РАЗРАБОТКА ВЕКТОРА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВЫСОКОПРОДУКТИВНОГО СТАБИЛЬНОГО ПРОДУЦЕНТА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ КЛАССА IGG

Кошелева Е.С.[1], Воронина Е.В.[2], Марыгин Р.А.[2], Миронова Е.М.[2], Клишин А.А.[1], Николаева В.В.[1], Серегин Ю.А.[2]

[1] НИЦ «Курчатовский Институт» – Курчатовский комплекс генетических исследований, Москва, Россия
117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1
[2] ООО «Фармапарк», Москва, Россия
117246, Москва, Научный проезд, д.8, стр.1
e-mail: tuzova_es@mail.ru

В настоящей работе предложен дизайн вектора для эффективной и стабильной экспрессии клетками *CHO* моноклональных антител класса IgG. Получен продуцент терапевтического антитела смешанного подкласса IgG2/4k, обеспечивающий высокую удельную продуктивность около 20 пкг/кл/день и стабильность экспрессии в течение двух месяцев.

Ключевые слова: вектор, моноклональное антитело, продуцент, клетки *CHO*, селекция

В рамках дизайна вектора были исследованы сочетания промоторов CMV, SV40 и гибрида CMV/hEF-1 с bGH-polyA-сигналом для экспрессии только тяжелой цепи антитела. Наряду с этим, изучали влияние наличия в конструкции UCOE-, MAR-, EBVTR- элементов на стабильность экспрессии и копийность гена интереса в геноме *CHO-S*. Для селекции и амплификации включали в конструкцию гены устойчивости к зеоцину и дегидрофолатредуктазы (DGFR). Одновременно с исследуемыми вариантами конструкций проводили трансфекцию клеток коммерческим вектором pCHO 1.0 (ген устойчивости для селекции в CHO - пуромицин), содержащим обе цепи моноклонального антитела.

Трансфекцию осуществляли методом электропорации с использованием системы Neon. Селекцию и амплификацию проводили путем добавления зеоцина, пуромицина и увеличивающихся концентраций метотрексата (1, 5, 10, 30 мкМ). Клоны отбирали методом предельных разведений. Культивирование суспензионной культуры клеток *CHO* проводили в колбах Эрленмейера при перемешивании на бессывороточной питательной среде. Концентрацию антитела в культуральной жидкости определяли методом аффинной ВЭЖХ Protein A. Число копий гена интереса и стабильность экспрессии антитела определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией.

Таким образом, показано, что для продуцентов, полученных с использованием вектора, где bGH-polyA-сигнал находился наряду с гибридным промотором, отмечена более высокая экспрессия целевого белка, по сравнению с теми, где в конструкции использовали промотор CMV или SV40. Показано, добавление MAR- и EBVTR-элементов позволяет увеличить удельную продуктивность на клетку и повысить стабильность экспрессии целевого белка. Кроме того, было отмечено, длительная амплификация под действием метотрексата в течение не менее одного месяца так же позволяет сохранить стабильность продуцента.

В результате использования сочетания коммерческого вектора pCHO 1.0 и конструкции, содержащей тяжелую цепь антитела под контролем CMV/hEF-1 промотора с bGH-polyA-сигналом, а также MAR- и EBVTR-элементы и ген DGFR выбрали клон с удельной продуктивностью не менее 20 пг/клетку/день. Продолжительность культивирования выбранного клона с периодическим добавлением подпитки в орбитальном биореакторе составила около 20 дней при сохранении жизнеспособности не менее 98 %. При этом максимальная клеточная плотность достигала 30 млн кл/мл, а общая продуктивность клона составила около 4 г/л.

UDC 577.218 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-35-36

DEVELOPMENT OF A VECTOR FOR CREATING A HIGHLY CONCENTRATED STABLE PRODUCT INTENDED FOR USE AS A MONOCLONAL ANTIBODY TO THE IGG CLASS

E.S. Kosheleva[1], E.V. Voronina[2], R.A. Marygin[2], E.M. Mironova[2], A.A. Klishin[2], V.V. Nikolaeva[2], Y.A. Seregin[2]

[1] State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia
117545, Moscow, 1-st Dorozhniy proezd, 1
[2] Pharmapark LLC, Moscow, Russia
117246, Moscow, Nauchny proezd, 8 build 1
e-mail: tuzova_es@mail.ru

In this work, vector design is proposed for effective and stable expression of IgG class monoclonal antibodies by *CHO* cells. A producer of the mixed IgG2/4k subclass therapeutic antibody was obtained, providing high specific productivity of about 20 pg/cell/day and stable expression for two months.

Key words: vector, monoclonal antibody, producer, *CHO* cells, selection

As part of the vector design, the combinations of CMV, SV40 promotors and the hybrid CMV/hsv-1 with a bGH-polyA signal were investigated for the expression of only a heavy antibody chain. Along with that, the influence of UCOE- and MAR-elements presence in vector on the expression stability and copyability of the gene of interest in the *CHO-S* genome was studied. For selection and amplification, zeocine and dihydrofolate reductase resistance genes (DGFR) was included in the construction. Simultaneously with the studied design variants, cells were transfected by the commercial vector pCHO 1.0 (the resistance gene for selection in *CHO* cells is puromicine), containing both chains of the monoclonal antibody.

Transfection was performed by electroporation using the Neon system. Selection and amplification was carried out by adding zeocine, puromicine and increasing concentrations of methotrexate (1, 5, 10, 30 mkM). Clones was selected by limiting dilutions method. Cultivation of the *CHO-S* cells suspension culture was carried out in Erlenmeyer flasks with stirring in serum-free nutrient medium. Concentration of the antibody was determined by affinity HPLC Protein A. The number of the gene of interest copies and the antibody expression stability were determined by real-time reverse transcription polymerase-chain reaction (PCR).

Thus, the producer obtained using the vector containing bGH-polyA-signal in combination the hybrid promotor demonstrated highly expression of the target protein, compared to those where the CMV or SV40 promotors was used in the design. The addition of MAR- and EBVTR-elements allows increasing specific productivity of the cells and boosting expression stability of the target protein. In addition, it was noticed that long-term amplification influenced by methotrexate for at least one month allows maintaining the producer stability.

Because of using a combination of the commercial vector pCHO 1.0 and the design containing antibody heavy chain controlled by the CMV/hEF-1 promotor with the bGH-polyA-signal as well as MAR- and EBVTR-elements and the DGFR gene, the clone with specific productivity about 20 pg/cell/day was selected. The duration of the fed-batch of the selected clone in the orbital bioreactor was about 20 days with maintaining viability of at least 98 %. At the same time maximum cells density reached 30 million cells/ml and total productivity of the clone was about 4 g/l.

УДК 57.017 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-36-39

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОДИАМИЧЕСКИХ ВЕЛИЧИН АКТИВИРОВАННОЙ КУМАРИНАМИ С-314, С-334 ИЛИ С-525 ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ КОМПЛЕКСА ЦИТОХРОМА С С КАРДИОЛИПИНОМ

Левченко И.Н., Владимиров Г.К., Володяев И.В.

Московский Государственный Университет, Физический факультет, Москва , Россия
119234, Москва, ул. Колмогорова, 1, стр. 2
e-mail: irnlevchenko@gmail.com

Текущая работа посвящена сравнению термодинамических величин энтропии, энтальпии и свободой энергии полученных теоретическим путем и из экспериментальных данных исследования процессов перикисного окисления липидов, запускаемых комплексом цитохрома *c* и кардиолипина в мембране и сопровождающей его хемилюминесценции активированной природными красителями кумаринами С-314, С-334 или С-525, каждым в отдельности. Формирование подлинной модели этого процесса позволяет использовать методы хемилюминесценции, как способ корректной оценки термодинамических величин цитохрома *c* и кардиолипина, то есть тщательнее исследовать его поведение в различных условиях.

Ключевые слова: Сенсибилизаторы, цитохром *c*, кардиолипин, кумариновый активатор С-314, кумариновый активатор С-334, кумариновый активатор С-525, энтропия, энтальпия, свободная энергия;

Сравнивая энтропию, энтальпию и свободную энергию активированной кумаринами С-314, С-334 или С-525 хемилюминесценции под действием комплекса цитохрома *c* с кардиолипином с этими же величинами посчитанными теоретическим путем. Мы получаем хемилюминесценцию усиленную кумаринами, которая показывает значение интенсивности хемилюминесценции, в ~1500, в ~1600 и в ~2000, соответственно, превышающее сверхслабое свечение, при этом схожа по кинетическим параметрам и имеет подобные константы скорости [4,6]. Подбор термодинамических величин энтропии, энтальпии и свободной энергии обуславливался присутствием кардиолипина для стабилизации pH, тушением Fe2+ и наличием кумариновых активаторов природного красителя С-314, природного красителя С-334 или природного красителя С-525, которые являются физическими и не влияют на процесс. Причины влияющие на погрешность значений энтропии, энтальпии и свободной энергии, недостаточное добавление перекиси водорода[2], не точное количество азота (II)[5,6], метанола, денатурация белка [1,5,6,7] и изменение комформации цитохрома *c* в комплексе цитохрома с с кардилипиом. Изучены системы липопероксидазных и квазилипоксигеназных реакций.

Работа основана на анализе цитохрома *c* с кардиолипином, физических природных активаторов кумаринов С-314, С-334, С-525 [1,3], пероксидазы хрена и люминола, проведено сравнение термодинамических характеристик системы: энтропии, энтальпии и свободной энергии, полученных из экспериментальных данных, с параметрами, полученными на основе теоретических расчетов.

Цитохром *C* с кардиолипином имеет различие с цитохромом по следующим характеристикам: (1) обладает флюоресценцией тирозина и триптофана; (2) теряет поглощение в полосе Cope (405–410 нм), отражающей существование связи *Fe(heme)···S(Met80)*; (3) обладает пероксидазной активностью и катализирует образование свободных радикалов; (4) пероксидазная активность зависит как от концентрации цитохрома *c* с кардиолипином, так и от количества денатурированной формы; (5) наибольшее значение точек пероксидазной активности при усилении хемилюминесценции активированной С-334, который увеличивал интенсивность свечения хемилюминесценции с коэффициентом более 1600 при концентрации 4 мкМ без какого-либо влияния на кинетику хемилюминесценции [1,4,5,8]; (6) механизм усиления хемилюминесценции – перенос энергии от молекулы кетона в электронно-возбужденном состоянии на флуоресцентный уровень любого из природных красителей; (7) термодинамические величины энтропии, энтальпии и свободной энергии, полученные из экспериментальных данных совпадают с теоретическими.

Литература

1. *Владимиров Г.К. Владимиров Ю.А. Структура и пероксидазная функция комплекса цитохрома с с кардиолипином в водой среде и в неполярном окружении.-2018.*
2. *Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В., Измайлов Д. Ю., Новиков А. А., Брусничкин А. А., Осипов А. Н., Каган В. Е. Механизм активации пероксидазной активности цитохрома с кардиолипином // Биохимия. – 2006. – Т. 71. – № 9. – С. 1215-1224.*
3. *Осипов А. Н., Степанов Г. О., Владимиров Ю. А., Козлов А. В., Каган В. Е. Регуляция пероксидазной активности цитохрома с с помощью оксида азота и лазерного излучения // Биохимия. – 2006. – Т. 71. – № 10. – С. 1392 - 1398.*
4. *Aspee A., Alarcon E., Pino E., Gorelsky S. I., Scaiano J. P. Coumarin 314 free radical cation: formation, properties, and reactivity toward phenolic antioxidants // The journal of physical chemistry. A. – 2012. – V. 116. – № 1. – P. 199-206.*
5. *Belikova N. A., Vladimirov Y. A., Osipov A. N., Kapralov A. A., Tyurin V. A., Potapovich M. V., Basova L. V., Peterson J., Kurnikov I. V., Kagan V. E. Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes // Biochemistry. – 2006. – V. 45. – № 15. – P. 4998-5009.*
6. *Jiang J., Bakan A., Kapralov A. A., Silva K. I., Huang Z., Amoscato A. A., Peterson J., Garapati V. K., Saxena S., Bayir H., Atkinson J., Bahar I., Kagan V. E. Designing inhibitors of cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes: mitochondria-targeted imidazole-substituted fatty acids // Free radical biology & medicine. – 2014. – V. 71. – P. 221-30.*

7. *Kapralov A. A., Yanamala N., Tyurina Y. Y., Castro L., Samhan-Arias A., Vladimirov Y. A., Maeda A., Weitz A. A., Peterson J., Mylnikov D., Demicheli V., Tortora V., Klein-Seetharaman J., Radi R., Kagan V. E. Topography of tyrosine residues and their involvement in peroxidation of polyunsaturated cardiolipin in cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes // Biochimica et Biophysica Acta. – 2011. – V. 1808. – № 9. – P. 2147-55.*

8. *Vladimirov Y. A., Sharov V. S., Driomina E. S., Reznitchenko A. V., Gashev S. B. Coumarin derivatives enhance the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation // Free radical biology & medicine. – 1995. – V. 18. – № 4. – P. 739-45.*

УДК 57.017 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-36-39

INVESTIGATION OF THERMODYNAMIC VALUES OF CHEMILUMINESCENCE ACTIVATED BY COUMARINS C-314, C-334 OR C-525 UNDER THE ACTION OF CYTOCHROME C COMPLEX WITH CARDIOLIPIN.

I.N. Levchenko, G.K. Vladimirov, I.V. Volodyaev

Moscow State University, Faculty of Physics, Moscow , Russia
119234, Moscow, Kolmogorova str., 1, p. 2
e-mail: irnlevchenko@gmail.com

The current work is devoted to comparing the thermodynamic values of entropy, enthalpy and energy freedom obtained theoretically and from experimental data on the study of lipid peroxidation processes triggered by the cytochrome *c* and cardiolipin complex in the membrane and its accompanying chemiluminescence activated by natural dyes coumarins C-314, C-334 or C-525, each separately. The formation of a genuine model of this process makes it possible to use chemiluminescence methods as a way to correctly assess the thermodynamic values of cytochrome *c* and cardiolipin, that is, to thoroughly investigate its behavior under various conditions.

Keywords: Sensitizers, cytochrome *c*, cardiolipin, coumarin activator C-314, coumarin activator C-334, coumarin activator C-525, entropy, enthalpy, free energy;

Comparing the entropy, enthalpy and free energy of the chemiluminescence activated by coumarins C-314, C-334 or C-525 under the action of the cytochrome *c* complex with cardiolipin with the same values calculated theoretically. We obtain a chemiluminescence enhanced by coumarins, which shows a chemiluminescence intensity value, in ~1500, in ~1600 and in ~2000, respectively, exceeding the ultra-weak glow, while it is similar in kinetic parameters and has similar velocity constants [4,6]. The selection of thermodynamic values of entropy, enthalpy and free energy was determined by the presence of cardiolipin for pH stabilization, quenching of Fe2+ and the presence of coumarin activators of natural dye C-314, natural dye C-334 or natural dye C-525, which are physical and do not affect the process. The reasons affecting the error of entropy, enthalpy and free energy values, insufficient addition of hydrogen peroxide [2], not the exact amount of nitrogen (II) [5,6], methanol, protein denaturation [1,5,6,7] and a change in the cytochrome *c* conformation in the cytochrome *c* complex with cardilipioma. Systems of lipoperoxidase and quasi-lipoxygenase reactions have been studied.

The work is based on the analysis of cytochrome *c* with cardiolipin, the physical natural activators of coumarins C-314, C-334, C-525 [1,3], horseradish peroxidase and luminol, a comparison of the thermodynamic characteristics of the system: entropy, enthalpy and free energy obtained from experimental data with the parameters obtained on the basis of theoretical calculations.

Cytochrome C with cardiolipin differs from cytochrome in the following characteristics: (1) has the fluorescence of tyrosine and tryptophan; (2) loses absorption in the Soret band (405-410 nm), reflecting the existence of the *Fe(heme)···S(Met80)* bond; (3) has peroxidase activity and catalyzes the formation of free radicals; (4) peroxidase activity depends on both the concentration of cytochrome c with cardiolipin, and from the amount of denatured form; (5) the highest value of peroxidase activity points with enhanced chemiluminescence activated C-334, which increased the luminescence intensity of chemiluminescence with a coefficient of more than 1600 at a concentration of 4 microns without any effect on the kinetics of chemiluminescence [1,4,5,8]; (6) the mechanism of chemiluminescence enhancement is the transfer of energy from a ketone molecule in an electronically excited state to a fluorescent the level of any of the natural dyes; (7) the thermodynamic values of entropy, enthalpy and free energy obtained from experimental data coincide with the theoretical ones;

References

1. *Vladimirov G.K. Vladimirov Yu.A. Structure and peroxidase function of the cytochrome c complex with cardiolipin in an aqueous medium and in a nonpolar environment.-2018.*

2. *Vladimirov Yu. A., Proskurina E. V., Izmailov D. Yu., Novikov A. A., Brusnichkin A. A., A. Osipov. N., V. Kagan. E. Mechanism of activation of cytochrome peroxidase activity with cardiolipin // Biochemistry. - 2006. – Vol. 71. – No. 9. – pp. 1215-1224.*

3. *A Osipov. N., Stepanov G. O., Vladimirov Yu. A., A Kozlov. V., V Kagan. E. Regulation of cytochrome c peroxidase activity using nitric oxide and laser radiation // Biochemistry. - 2006. – Vol. 71. – No. 10. – pp. 1392 - 1398.*

4. *Aspee A., Alarcon E., Pino E., Gorelsky S. I., Scaiano J. P. Coumarin 314 free radical cation: formation, properties, and reactivity toward phenolic antioxidants // The journal of physical chemistry. A. – 2012. – V. 116. – № 1. – P. 199-206.*

5. *Belikova N. A., Vladimirov Y. A., Osipov A. N., Kapralov A. A., Tyurin V. A., Potapovich M. V., Basova L. V., Peterson J., Kurnikov I. V., Kagan V. E. Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes // Biochemistry. – 2006. – V. 45. – № 15. – P. 4998-5009.*

6. *Jiang J., Bakan A., Kapralov A. A., Silva K. I., Huang Z., Amoscato A. A., Peterson J., Garapati V. K., Saxena S., Bayir H., Atkinson J., Bahar I., Kagan V. E. Designing inhibitors of cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes: mitochondria-targeted imidazole-substituted fatty acids // Free radical biology & medicine. – 2014. – V. 71. – P. 221-30.*

7. *Kapralov A. A., Yanamala N., Tyurina Y. Y., Castro L., Samhan-Arias A., Vladimirov Y. A., Maeda A., Weitz A. A., Peterson J., Mylnikov D., Demicheli V., Tortora V., Klein-Seetharaman J., Radi R., Kagan V. E. Topography of tyrosine residues and their involvement in peroxidation of polyunsaturated cardiolipin in cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes // Biochimica et Biophysica Acta. – 2011. – V. 1808. – № 9. – P. 2147-55.*

8. *Vladimirov Y. A., Sharov V. S., Driomina E. S., Reznitchenko A. V., Gashev S. B. Coumarin derivatives enhance the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation // Free radical biology & medicine. – 1995. – V. 18. – № 4. – P. 739-45.*

УДК 57.017 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-39-41

МОДЕЛИРОВАНИЕ ТОЧЕК ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВОСТИ АКТИВИРОВАННОЙ ПРИРОДНЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ КУМАРИНАМИ С-314 И С-525 ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ КОМПЛЕКСА ЦИТОХРОМА С С КАРДИОЛИПИНОМ.

Левченко И.Н., Владимиров Г.К., Володяев И.В.

Московский Государственный Университет, Физический факультет, Москва, Россия
119234, Москва, ул. Колмогорова, 1, стр. 2

Текущая работа посвящена математическому моделированию процессов перекисного окисления липидов и сопровождающей его хемилюминесценции, запускаемых комплексом CytC-CL в мембране. Формирование подлинной модели этого процесса позволяет использовать методы хемилюминесценции, как способ корректной оценки ферментативной активности CytC-CL, то есть тщательнее исследовать его поведение в различных условиях.

Ключевые слова: Сенсибилизаторы, цитохром *c*, кардиолипин, кумариновый активатор С-314, кумариновый активатор С-525, точки пероксидазной активности, хемилюминесценции;

Хемилюминесценция активированная природными красителями кумаринами С-314 или С-525 имеет интенсивность, соответственно, в ~1600 или ~2000 раз выше, чем спонтанная интенсивность хемилюминесценции липидов, при этом не отличается от нее по параметрам кинетических кривых и может быть использована для решения поставленной задачи сравнения моделирования количества и величины точек ферментативной активности активированной кумаринами С-314 и С-525 хемилюминесценции под действием комплекса цитохрома *С* с кардиолипином [4,6]. На основании анализа параметров комплекса CytC-CL кумарина С-314, кумарина С-525, пероксидазы хрена и люминола, проведены исследования сравнения сенсибилизирующей способности природных красителей кумаринов С-314 и С-525, как физических активаторов с целью уточнения значений и количества точек ферментативной активности [1,5,6,7].

Комплекс CytC-CL отличается от нативного CytC по следующим свойствам: (1) обладает флуоресценцией тирозиновых и триптофановых остатков; (2) теряет поглощение в полосе Соре (405–410 нм), отражающей наличие связи *Fe(heme)···S(Met80)* [2]; (3) обладает ферментативной активностью и катализирует образование липидных радикалов в мембране, которые запускают цепной процесс перекисного окисления липидов [1,3]. Данный процесс можно наблюдать по хемилюминесценции, как нативной, так и активированной, так же определять количество и величину точек ферментативной активности [8].

Для того чтобы сделать моделирование величины и количества точек ферментативной активности, нужно учесть, что: (a) ферментативная активность зависит как от концентрации CytC, так и от соотношения определяющего процент абсолютного количества денатурированной формы; (b) максимальная величина точек ферментативной активности наблюдалось при усилении хемилюминесценции, при максимальном квантовом выходе; (c) механизм усиления хемилюминесценции – перенос энергии от молекулы кетона в электронно-возбужденном состоянии на флуоресцентный уровень природного красителя кумарина C-334 или природного красителя кумарина C-525 .

Литература

1. *Владимиров Г.К. Владимиров Ю.А. Структура и пероксидазная функция комплекса цитохрома с с кардиолипином в водой среде и в неполярном окружении.-2018.*
2. *Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю., Новиков А.А., Брусничкин А.А., Осипов А.Н., Каган В.Е. Механизм активации пероксидазной активности цитохрома с кардиолипином // Биохимия. – 2006. – Т. 71. – № 9. – С. 1215-1224.*
3. *Осипов А.Н., Степанов Г.О., Владимиров Ю.А., Козлов А.В., Каган В.Е. Регуляция пероксидазной активности цитохрома с с помощью оксида азота и лазерного излучения // Биохимия. – 2006. – Т. 71. – № 10. – С. 1392 - 1398.*
4. *Aspee A., Alarcon E., Pino E., Gorelsky S. I., Scaiano J. P. Coumarin 314 free radical cation: formation, properties, and reactivity toward phenolic antioxidants // The journal of physical chemistry. A. – 2012. – V. 116. – № 1. – P. 199-206.*
5. *Belikova N.A., Vladimirov Y.A., Osipov A.N., Kapralov A.A., Tyurin V.A., Potapovich M.V., Basova L.V., Peterson J., Kurnikov I.V., Kagan V.E. Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes // Biochemistry. – 2006. – V. 45. – № 15. – P. 4998-5009.*
6. *Jiang J., Bakan A., Kapralov A.A., Silva K.I., Huang Z., Amoscato A.A., Peterson J., Garapati V.K., Saxena S., Bayir H., Atkinson J., Bahar I., Kagan V.E. Designing inhibitors of cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes: mitochondria-targeted imidazole-substituted fatty acids // Free radical biology & medicine. – 2014. – V. 71. – P. 221-30.*
7. *Kapralov A.A., Yanamala N., Tyurina Y.Y., Castro L., Samhan-Arias A., Vladimirov Y.A., Maeda A., Weitz A.A., Peterson J., Mylnikov D., Demicheli V., Tortora V., Klein-Seetharaman J., Radi R., Kagan V.E. Topography of tyrosine residues and their involvement in peroxidation of polyunsaturated cardiolipin in cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes // Biochimica et Biophysica Acta. – 2011. – V. 1808. – № 9. – P. 2147-55.*
8. *Vladimirov Y.A., Sharov V.S., Driomina E.S., Reznitchenko A.V., Gashev S.B. Coumarin derivatives enhance the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation // Free radical biology & medicine. – 1995. – V. 18. – № 4. – P. 739-45.*

UDC 57.017 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-39-41

MODELING OF POINTS OF ENZYMATIC ACTIVITY ACTIVATED BY NATURAL DYES COUMARINS C-314 AND C-525 CHEMILUMINESCENCE UNDER THE ACTION OF CYTOCHROME C COMPLEX WITH CARDIOLIPIN

I.N. Levchenko, G.K. Vladimirov, I.V. Volodyaev

Moscow State University, Faculty of Physics, Moscow, Russia
119234, Moscow, Kolmogorova str., 1, p. 2
e-mail: irnlevchenko@gmail.com

The current work is devoted to mathematical modeling of lipid peroxidation processes and accompanying chemiluminescence triggered by the CytC-CL complex in the membrane. The formation of a genuine model of this process makes it possible to use chemiluminescence methods as a way to correctly assess the enzymatic activity of CytC-CL, that is, to thoroughly investigate its behavior under various conditions.

Keywords: Sensitizers, cytochrome c, cardiolipin, coumarin activator C-314, coumarin activator C-525, points of peroxidase activity, chemiluminescence

Chemiluminescence activated by natural dyes coumarins C-314 or C-525 has an intensity, respectively, ~ 1600 or ~2000 times higher than the spontaneous intensity of lipid chemiluminescence, while it does not differ from it in the parameters of kinetic curves and can be used to solve the problem of comparing the simulation of the number and magnitude of points of enzymatic activity activated by coumarins C-314 and C-525 chemiluminescence under the action of cytochrome C complex with cardiolipin [4,5]. Based on the analysis of the parameters of the CytC-CL complex of coumarin C-314, coumarin C-525, horseradish peroxidase and luminol [2], studies were conducted comparing the sensitizing ability of natural dyes coumarins C-314 and C-525 as physical activators in order to clarify the values and number of points of enzymatic activity [1,5,6,7].

The CytC-CL complex differs from the native CytC in the following properties: (1) it has the fluorescence of tyrosine and tryptophan residues; (2) it loses absorption in the Soret band (405-410 nm), reflecting the presence of *Fe(heme)···S(Met80)* bond; (3) it has enzymatic activity and catalyzes the formation of lipid radicals in the membrane that trigger the chain process of lipid peroxidation [1,3]. This process can be observed by chemiluminescence, both native and activated, as well as determine the number and magnitude of points of enzymatic activity [8].

In order to make a simulation of the magnitude and number of points of enzymatic activity, it should be taken into account that: (a) enzymatic activity depends both on the concentration of CytC and on the ratio determining the percentage of the absolute amount of denatured form; (b) the maximum value of the points of enzymatic activity was observed with increased chemiluminescence, with maximum quantum yield; (c)the mechanism of chemiluminescence enhancement is the transfer of energy from a ketone molecule in an electronically excited state to the fluorescent level of the natural dye coumarin C-334 or the natural dye coumarin C-525.

References

1. *Vladimirov G.K. Vladimirov Yu.A. Structure and peroxidase function of the cytochrome c complex with cardiolipin in an aqueous medium and in a nonpolar environment.-2018.*
2. *Vladimirov Yu. A., Proskurina E. V., Izmailov D. Yu., Novikov A. A., Brusnichkin A. A., A. Osipov. N., V. Kagan. E. Mechanism of activation of cytochrome peroxidase activity with cardiolipin // Biochemistry. - 2006. – Vol. 71. – No. 9. – pp. 1215-1224.*
3. *A Osipov. N., Stepanov G. O., Vladimirov Yu. A., A Kozlov. V., V Kagan. E. Regulation of cytochrome c peroxidase activity using nitric oxide and laser radiation // Biochemistry. - 2006. – Vol. 71. – No. 10. – pp. 1392 - 1398.*
4. *Aspee A., Alarcon E., Pino E., Gorelsky S. I., Scaiano J. P. Coumarin 314 free radical cation: formation, properties, and reactivity toward phenolic antioxidants // The journal of physical chemistry. A. – 2012. – V. 116. – № 1. – P. 199-206.*
5. *Belikova N. A., Vladimirov Y. A., Osipov A. N., Kapralov A. A., Tyurin V. A., Potapovich M. V., Basova L. V., Peterson J., Kurnikov I. V., Kagan V. E. Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes // Biochemistry. – 2006. – V. 45. – № 15. – P. 4998-5009.*
6. *Jiang J., Bakan A., Kapralov A. A., Silva K. I., Huang Z., Amoscato A. A., Peterson J., Garapati V. K., Saxena S., Bayir H., Atkinson J., Bahar I., Kagan V. E. Designing inhibitors of cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes: mitochondria-targeted imidazole-substituted fatty acids // Free radical biology & medicine. – 2014. – V. 71. – P. 221-30.*
7. *Kapralov A. A., Yanamala N., Tyurina Y. Y., Castro L., Samhan-Arias A., Vladimirov Y. A., Maeda A., Weitz A. A., Peterson J., Mylnikov D., Demicheli V., Tortora V., Klein-Seetharaman J., Radi R., Kagan V. E. Topography of tyrosine residues and their involvement in peroxidation of polyunsaturated cardiolipin in cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes // Biochimica et Biophysica Acta. – 2011. – V. 1808. – № 9. – P. 2147-55.*
8. *Vladimirov Y. A., Sharov V. S., Driomina E. S., Reznitchenko A. V., Gashev S. B. Coumarin derivatives enhance the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation // Free radical biology & medicine. – 1995. – V. 18. – № 4. – P. 739-45.*

УДК 57.017 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-42-44

МОДЕЛИРОВАНИЕ ТОЧЕК ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ АКТИВИРОВАННОЙ ПРИРОДНЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ КУМАРИНАМИ С-314, С-334. С-525 ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ КОМПЛЕКСА ЦИТОХРОМА С С КАРДИОЛИПИНОМ КАК ГЕТЕРОГЕННОГО КАТАЛИЗАТОРА

Левченко И.Н., Владимиров Г.К., Володяев И.В.

Московский Государственный Университет, Физический факультет, Москва , Россия
119234, Москва, ул. Колмогорова, 1, стр. 2
e-mail: irnlevchenko@gmail.com

Текущая работа посвящена моделированию процессов перекисного окисления липидов и сопровождающей его хемилюминесценции , запускаемых гетерогенным катализатором комплексом CytC-CL в мембране. Формирование подлинной модели этого процесса позволяет использовать методы ХЛ, как способ корректной оценки ферментативной активности CytC-CL

Ключевые слова: Сенсибилизаторы, цитохром *c*, кардиолипин, кумариновый активатор С-314, кумариновый активатор С-334, кумариновый активатор С-525, гетерогенный катализатор

Хемилюминесценции, активированная кумаринами С-314, С-334 и С-525 имеет интенсивность в ~1500, ~1600, ~2000 раз выше, чем спонтанная хемилюминесценции липидов, при этом не отличается от нее по параметрам кинетических кривых и может быть использована для решения поставленной задачи сравнения моделирования количества и величины точек ферментативной активности активированной кумаринами С-314,С-334 и С-525 хемилюминесценции под действием комплекса цитохрома *С* с кардиолипином как катализатора. Этот комплекс образует наночастицы диаметром 8-11 нм, которые освобождаются центрифугированием и имеют стандартный размер и структуру. Таким образом комплекс цитохром с с кардиолипином ближе соответствует гетерогенным катализаторам, чем гомогенным, хотя в полном смысле описание гетерогенного катализатора к нему не подходит. Тем не менее в первом приближении мы используем этот формализм. На основании анализа параметров комплекса CytC-CL, как катализатора , кумарина С-314, кумарина С-334, кумарина С-525,пероксидазы хрена и люминола, проведены исследования сравнения сенсибилизирующей способности кумаринов С-314 , С-334 и С-525, как физических активаторов с целью уточнения значений и количества точек ферментативной активности.

Комплекс CytC-CL является катализатором и отличается от нативного CytC по следующим свойствам: (1) обладает флуоресценцией тирозиновых и триптофановых остатков; (2) теряет поглощение в полосе Соре (405–410 нм), отражающей наличие связи *Fe(heme)···S(Met80)*; (3) обладает ферментативной активностью и катализирует образование липидных радикалов в мембране, которые запускают цепной процесс перекисного окисления липидов. Данный процесс можно наблюдать по хемилюминесценции, как нативной, так и активированной, так же определять количество и величину точек ферментативной активности.

Для того чтобы сделать моделирование величины и количества точек ферментативной активности, нужно учесть, что: (a) ферментативная активность зависит как от концентрации CytC, так и от соотношения определяющего процент абсолютного количества денатурированной формы; (b) величина точек ферментативной активности наблюдалось при усилении ХЛ; (c)механизм усиления хемилюминесценции – перенос энергии от молекулы кетона в электронно-возбужденном состоянии на флуоресцентный уровень природного красителя кумарина С-314,природного красителя кумарина С-334 или природного красителя кумарина С-525 .

Литература

1. *Владимиров Г.К. Владимиров Ю.А. Структура и пероксидазная функция комплекса цитохрома с с кардиолипином в водой среде и в неполярном окружении.-2018.*
2. *Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю., Новиков А.А., Брусничкин А.А., Осипов А.Н., Каган В.Е. Механизм активации пероксидазной активности цитохрома с кардиолипином // Биохимия. – 2006. – Т. 71. – № 9. – С. 1215-1224.*
3. *Осипов А.Н., Степанов Г.О., Владимиров Ю.А., Козлов А.В., Каган В.Е. Регуляция пероксидазной активности цитохрома с с помощью оксида азота и лазерного излучения // Биохимия. – 2006. – Т. 71. – № 10. – С. 1392 - 1398.*

4. *Aspee A., Alarcon E., Pino E., Gorelsky S. I., Scaiano J. P. Coumarin 314 free radical cation: formation, properties, and reactivity toward phenolic antioxidants // The journal of physical chemistry. A. – 2012. – V. 116. – № 1. – P. 199-206.*
5. *Belikova N.A., Vladimirov Y.A., Osipov A.N., Kapralov A.A., Tyurin V.A., Potapovich M.V., Basova L.V., Peterson J., Kurnikov I.V., Kagan V.E. Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes // Biochemistry. – 2006. – V. 45. – № 15. – P. 4998-5009.*
6. *Jiang J., Bakan A., Kapralov A.A., Silva K.I., Huang Z., Amoscato A.A., Peterson J., Garapati V.K., Saxena S., Bayir H., Atkinson J., Bahar I., Kagan V.E. Designing inhibitors of cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes: mitochondria-targeted imidazole-substituted fatty acids // Free radical biology & medicine. – 2014. – V. 71. – P. 221-30.*
7. *Kapralov A.A., Yanamala N., Tyurina Y.Y., Castro L., Samhan-Arias A., Vladimirov Y.A., Maeda A., Weitz A.A., Peterson J., Mylnikov D., Demicheli V., Tortora V., Klein-Seetharaman J., Radi R., Kagan V.E. Topography of tyrosine residues and their involvement in peroxidation of polyunsaturated cardiolipin in cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes // Biochimica et Biophysica Acta. – 2011. – V. 1808. – № 9. – P. 2147-55.*
8. *Vladimirov Y.A., Sharov V.S., Driomina E.S., Reznitchenko A.V., Gashev S.B. Coumarin derivatives enhance the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation // Free radical biology & medicine. – 1995. – V. 18. – № 4. – P. 739-45.*

UDC 57.017 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-42-44

MODELING OF POINTS OF ENZYMATIC ACTIVITY ACTIVATED BY NATURAL DYES COUMARINS C-314, C-334. C-525 CHEMILUMINESCENCE UNDER THE ACTION OF CYTOCHROME C COMPLEX WITH CARDIOLIPIN AS A HETEROGENEOUS CATALYST.

I.N. Levchenko, G.K. Vladimirov, I.V. Volodyaev

Moscow State University, Faculty of Physics, Moscow, Russia
119234, Moscow, Kolmogorova str., 1, p. 2
e-mail: irnlevchenko@gmail.com

The current work is devoted to modeling the processes of lipid peroxidation and its accompanying chemiluminescence triggered by a heterogeneous catalyst CytC-CL complex in the membrane. The formation of a genuine model of this process allows the use of CL methods as a way to correctly assess the enzymatic activity of CytC-CL.

Keywords: Sensitizers, cytochrome *c*, cardiolipin, coumarin activator C-314, coumarin activator C-334, coumarin activator C-525, heterogeneous catalyst

Chemiluminescence activated by coumarins C-314, C-334 and C-525 has an intensity ~1500, ~1600, ~2000 times higher than spontaneous chemiluminescence of lipids, while it does not differ from it in the parameters of kinetic curves and can be used to solve the problem of comparing the simulation of the number and magnitude of points of enzymatic activity activated by coumarins C-314, C-334 and C-525 chemiluminescence under the action of a cytochrome C complex with cardiolipin as a catalyst. This complex forms nanoparticles with a diameter of 8-11 nm, which are released by centrifugation and have a standard size and structure. Thus, the cytochrome c complex with cardiolipin corresponds more closely to heterogeneous catalysts than to homogeneous ones, although in the full sense the description of a heterogeneous catalyst does not fit it. Nevertheless, we use this formalism as a first approximation. Based on the analysis of the parameters of the CytC-CL complex as a catalyst, coumarin C-314, coumarin C-334, coumarin C-525, horseradish peroxidase and luminol, studies were conducted comparing the sensitizing ability of coumarins C-314, C-334 and C-525 as physical activators in order to clarify the values and the number of points enzymatic activity.

The CytC-CL complex is a catalyst and differs from the native CytC in the following properties: (1) it has the fluorescence of tyrosine and tryptophan residues; (2) it loses absorption in the Soret band (405-410 nm), reflecting the presence of *Fe(heme)···S(Met80)* bond; (3) it has enzymatic activity and catalyzes the formation of lipid radicals in the membrane, which trigger the chain process of lipid peroxidation. This process can be observed by chemiluminescence, both native and activated, as well as determine the number and magnitude of points of enzymatic activity.

In order to make a simulation of the magnitude and number of points of enzymatic activity, it should be taken into account that: (a) enzymatic activity depends both on the concentration of CytC and on the ratio determining the percentage of the absolute amount of denatured form; (b) the magnitude of the points of enzymatic activity was observed with an increase in CL; (c) the mechanism of chemiluminescence enhancement is energy transfer from the ketone molecule in the electronically excited state to the fluorescent level of the natural dye coumarin C-314, the natural dye coumarin C-334 or the natural dye coumarin C-525.

References

1. *Vladimirov G.K. Vladimirov Yu.A. Structure and peroxidase function of the cytochrome c complex with cardiolipin in an aqueous medium and in a nonpolar environment.-2018.*
2. *Vladimirov Yu. A., Proskurina E. V., Izmailov D. Yu., Novikov A. A., Brusnichkin A. A., A. Osipov. N., V. Kagan. E. Mechanism of activation of cytochrome peroxidase activity with cardiolipin // Biochemistry. - 2006. – Vol. 71. – No. 9. – pp. 1215-1224.*
3. *A Osipov. N., Stepanov G. O., Vladimirov Yu. A., A Kozlov. V., V Kagan. E. Regulation of cytochrome c peroxidase activity using nitric oxide and laser radiation // Biochemistry. - 2006. – Vol. 71. – No. 10. – pp. 1392 - 1398.*
4. *Aspee A., Alarcon E., Pino E., Gorelsky S. I., Scaiano J. P. Coumarin 314 free radical cation: formation, properties, and reactivity toward phenolic antioxidants // The journal of physical chemistry. A. – 2012. – V. 116. – № 1. – P. 199-206.*
5. *Belikova N. A., Vladimirov Y. A., Osipov A. N., Kapralov A. A., Tyurin V. A., Potapovich M. V., Basova L. V., Peterson J., Kurnikov I. V., Kagan V. E. Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes // Biochemistry. – 2006. – V. 45. – № 15. – P. 4998-5009.*
6. *Jiang J., Bakan A., Kapralov A. A., Silva K. I., Huang Z., Amoscato A. A., Peterson J., Garapati V. K., Saxena S., Bayir H., Atkinson J., Bahar I., Kagan V. E. Designing inhibitors of cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes: mitochondria-targeted imidazole-substituted fatty acids // Free radical biology & medicine. – 2014. – V. 71. – P. 221-30.*
7. *Kapralov A. A., Yanamala N., Tyurina Y. Y., Castro L., Samhan-Arias A., Vladimirov Y. A., Maeda A., Weitz A. A., Peterson J., Mylnikov D., Demicheli V., Tortora V., Klein-Seetharaman J., Radi R., Kagan V. E. Topography of tyrosine residues and their involvement in peroxidation of polyunsaturated cardiolipin in cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes // Biochimica et Biophysica Acta. – 2011. – V. 1808. – № 9. – P. 2147-55.*
8. *Vladimirov Y. A., Sharov V. S., Driomina E. S., Reznitchenko A. V., Gashev S. B. Coumarin derivatives enhance the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation // Free radical biology & medicine. – 1995. – V. 18. – № 4. – P. 739-45.*

УДК 616.98:579.852.11 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-44-46

ВЛИЯНИЕ АЛЛИЛПОЛИАЛКОКСИБЕНЗОЛОВ НА ОКСИДАЗНУЮ И ДЕГИДРОГЕНАЗНУЮ АКТИВНОСТИ МЕМБРАНОТРОПНЫХ ФЕРМЕНТОВ: ГАЛАКТОНОЛАКТОНОКСИДАЗЫ ИЗ TRYPANOSOMA CRUZI И L-ГАЛАКТОНО-1,4-ЛАКТОНДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ARABIDOPSIS THALIANA

Чудин А.А., Кудряшова Е.В.

*Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
кафедра химической энзимологии
e–mail: andrew_18@inbox.ru*

Галактонолактоноксидаза из *Trypanosoma cruzi* (TcGAL) – мембранный фермент, катализирующий финальную стадию синтеза витамина С, который болезнетворный микроорганизм-паразит *T.cruzi*, не способен поглощать извне и вынужден синтезировать самостоятельно. TcGAL рассматривается нами как потенциальная лекарственная мишень и, согласно нашим данным, эффективно ингибируется соединениями класса аллилполиалкоксибензолов (АПАБ). Однако следует учесть, что TcGAL обладает одновременно двумя видами активности – оксидазной и дегидрогеназной с преобладанием последней, поэтому важно выяснить степень воздействия АПАБ в отношении каждой из этих активностей. Для этого в данной работе рассматривается набор из TcGAL и двух форм гомологичного фермента L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH) – дикой и мутантной (замена A113G), проявляющих только дегидрогеназную или только оксидазную активность соответственно. Таким образом, целью данной работы является исследование и сравнение влияния АПАБ на активность TcGAL и двух форм AtGALDH.

Ключевые слова: галактонолактоноксидаза; ФАД-зависимые дегидрогеназы; L-галактон-1,4-лактондегидрогеназа; аллилполиалкоксибензолы; ингибиторы; обращенные мицеллы АОТ.

В настоящее время около 8 млн людей во всём мире инфицированы одноклеточным паразитом *T.cruzi*, вызывающим болезнь Шагаса, лечение которой в настоящее время (нифуртимоксом и бензнидазолом) недостаточно эффективно. Рассматривая TcGAL как лекарственную мишень, мы ранее показали эффективность АПАБ как ингибиторов TcGAL [1], однако остается неясным на какой из типов активностей TcGAL (оксидазную или дегидрогеназную) АПАБ оказывает основное влияние. Для выяснения этого аспекта мы использовали гомологичного фермента AtGALDH и его мутантную (A113G) форму, которые проявляют либо дегидрогеназную, либо оксидазную активность соответственно. Важным является и влияние мембранной матрицы на ингибирование ферментов, поскольку TcGAL является мембранным ферментом, в то время как AtGALDH – факультативно мембранный фермент и проявляет активность как в водной, так и в мицеллярной средах.

В данной работе изучено влияние АПАБ на активность TcGAL и AtGALDH в водном буферном растворе (pH 8,8) и в системе обращённых мицелл АОТ (модель биомембраны). Обнаружено, что в водной среде оксидазная форма AtGALDH (A113G) ингибируется на 40-80 %, в то время как дегидрогеназная форма (исходный фермент) ингибируется лишь на 20-40 % (при [АПАБ] = 500 мкМ). При этом в мицеллярной среде дикий AtGALDH не ингибируется АПАБ совсем, включая те АПАБ (например, диллапиол и аллилтетраметоксибензол), которые были эффективны как в отношении обеих форм AtGALDH в водной среде, так и в отношении TcGAL в мицеллах. Учитывая эти данные и высокую гомологию активных центров AtGALDH и TcGAL, можно предположить, что в случае TcGAL соединения ряда АПАБ оказывают большее влияние на оксидазную активность. Наблюдается выраженная зависимость эффективности ингибирования от среды (водной или мицеллярной) для дикого AtGALDH: фермент ингибируется АПАБ в водной среде, однако не подвержен влиянию АПАБ в мицеллах. Учитывая эффективное ингибирование TcGAL соединениями ряда АПАБ в мицеллах и концентрирование АПАБ на границе раздела фаз, можно сделать вывод о разном пространственном распределении AtGALDH и TcGAL в мицеллах (AtGALDH – по всему объёму мицеллы, TcGAL – преимущественно на границе раздела фаз), что и обуславливает разную эффективность ингибирования этих двух ферментов.

Таким образом, в данной работе обнаружено более выраженное ингибирование соединениями ряда АПАБ оксидазной формы AtGALDH в сравнении с дегидрогеназной и выявлена зависимость эффективности ингибирования от используемой среды (мицеллярной или водной) на примере двух форм AtGALDH и TcGAL. Полученные данные важны для понимания механизма ингибирования, а также особенностей взаимодействия и топологии активного цента в функционировании оксидаз и дегидрогеназ.

Литература

1. *Allylpolyalkoxybenzene inhibitors of galactonolactone oxidase from trypanosoma cruzi / A.A. Chudin, I.D. Zlotnikov, S.S. Krylov et al. // Biochemistry (Moscow). — 2023. — Vol. 88, no. 1. — P. 131–141.*

UDC 616.98:579.852.11 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-44-46

IMPACT OF ALLYLPOLYALKOXYBENZENES ON OXIDASE AND DEHYDROGENASE ACTIVITIES OF MEMBRANOTROPIC ENZYMES: GALACTONOLACTON OXIDASE FROM TRYPANOSOMA CRUZI AND L-GALACTONO-1,4-LACTONE DEHYDROGENASE FROM ARABIDOPSIS THALIANA

A.A. Chudin, E.V. Kudryashova

*Chemical Faculty of Lomonosov Moscow State University, Department of Chemical Enzymology
e–mail: andrew_18@inbox.ru*

Galactonolactone oxidase from *Trypanosoma cruzi* (TcGAL) is a membrane enzyme that catalyzes the final step in the synthesis of vitamin C, which the pathogenic microorganism parasite *T.cruzi* cannot assimilate from the outside and must synthesize itself. We consider TcGAL as a potential drug target and, according to our data, TcGAL is effectively inhibited by compounds of the allylpolyalkoxybenzene (APAB) class. However, it should be taken into account that TcGAL simultaneously has two types of activity, oxidase and dehydrogenase, with the latter

predominating, so it is important to find out the degree of APAB influence on each of these activities. For this purpose, a set of enzymes is considered in this wok: TcGAL and two forms of the homologous enzyme L-galacton-1,4-lactone dehydrogenase from Arabidopsis thaliana (AtGALDH), wild and mutant (replacement A113G), exhibiting only dehydrogenase or only oxidase activity, respectively. Thus, the goal of this work is to study and compare the impact of APABs on the activity of TcGAL and two forms of AtGALDH.

Key words: galactonolactone oxidase; FAD-dependent dehydrogenases; L-galactone-1,4-lactone dehydrogenase; allylpolyalkoxybenzenes; inhibitors; reverse micelles AOT.

Nowdays, about 8 million people worldwide are infected with the single-celled parasite *T. cruzi*, which causes Chagas disease, the treatment of which is currently not effective enough (by nifurtimox and benznidazole). Considering TcGAL as a drug target, we have previously shown the effectiveness of APABs as inhibitors of TcGAL [1], but it remains unclear which type of TcGAL activity (oxidase or dehydrogenase) APABs have the main effect on. To elucidate this aspect, we used the homologous enzyme AtGALDH and its mutant (A113G) form, which exhibit either dehydrogenase or oxidase activity, respectively. The effect of the membrane matrix on enzyme inhibition is also important, since TcGAL is a membrane enzyme, while AtGALDH is a facultative membrane enzyme and is active both in aqueous and micellar media.

In this work, we studied the influence of APABs on the activity of TcGAL and AtGALDH in an aqueous buffer solution (pH 8.8) and in the system of reverse AOT micelles (biomembrane model). It was found that, in an aqueous medium, the oxidase form of AtGALDH (A113G) is inhibited by 40–80%, while the dehydrogenase form (original enzyme) is inhibited by only 20–40% (at [APAB] = 500 μM). At the same time, in a micellar medium, wild AtGALDH is not inhibited at all by APABs, including those APABs (for example, dillapiol and allyltetramethoxybenzene) that were effective both against both forms of AtGALDH in an aqueous medium and against TcGAL in micelles. Considering these data and the high homology of the active sites of AtGALDH and TcGAL, it can be assumed that, in the case of TcGAL, APABs have a greater effect on oxidase activity. A pronounced dependence of the inhibition efficiency on the medium (aqueous or micellar) for wild AtGALDH is observed: the enzyme is inhibited by APABs in an aqueous medium, but is not affected by APABs in micelles. Taking into account the effective inhibition of TcGAL by APABs in micelles and the localization of APABs at the interphase, we can conclude that the spatial distribution of AtGALDH and TcGAL in micelles is different (AtGALDH is over the entire volume of the micelle, TcGAL is mainly at the interphase), which determines the different inhibition efficiency of these two enzymes.

Thus, in this work, a more pronounced inhibition of the oxidase form of AtGALDH by APABs in comparison with the dehydrogenase form was found in this work, and the dependence of the inhibition efficiency on the medium used (micellar or aqueous) was revealed using the example of two forms of AtGALDH and TcGAL. The data obtained are important for understanding the mechanism of inhibition, as well as the features of the interaction and topology of the active site in the functioning of oxidases and dehydrogenases.

References

1. Allylpolyalkoxybenzene inhibitors of galactonolactone oxidase from trypanosoma cruzi / A.A. Chudin, I.D. Zlotnikov, S.S. Krylov et al. // Biochemistry (Moscow). — 2023. — Vol. 88, no. 1. — P. 131–141.

УДК 577.352.2, 577.35 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-46-49

АТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИАГРЕГАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ С ГЛУТАТИОНОМ И ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТОЙ

В.А. Щелконогов[1,2,3], А.М. Иншакова[1], Е.С. Дарнотук[1], Н.А. Суриков[1], А.Ю. Евстратова[1], О.А. Баранова[2,3], А.В. Чеканов[2,3], К.Д. Казаринов[3], Н.С. Шастина[1], Э.Ю. Соловьева[2], А.И. Федин[2]

[1] МИРЭА-Российский технологический университет (ИТХТ имени 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. РФ, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1
[3] ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН, Россия, 141190, Фрязино, пл. Введенского, 1

Были получены наночастицы (НЧ) с глутатионом (GSH) и липоевой кислотой (ЛК) с размером частиц от 40 до 330 нм, характеризующиеся эффективностью включения (ЭВ) глутатиона 37±5% и ЛК 85±10% в нанодисперсиях (НД), их медленным высвобождением из наноконструкций, а также обладающие высокой

коллоидной стабильностью при длительном хранении при комнатной температуре. Было показано, что НЧ с глутатионом и ЛК обладают выраженными антиоксидантными и антиагрегационным свойствами.

Ключевые слова: наночастицы, глутатион, липоевая кислота, нейтрофилы, свободные радикалы, тромбоциты.

Сосудистые заболевания головного мозга относятся к числу наиболее распространенных форм патологии ЦНС с высокой инвалидизацией и смертностью [1]. К основным патогенетическим механизмам ишемического инсульта относят: возникновение и прогрессирование окислительного стресса, нарушения сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостазов, повреждения ГЭБ и др [2]. Терапия данной патологии включает применение препаратов, проявляющих антиоксидантное действие, препятствующих агрегации тромбоцитов. Наиболее перспективными антиоксидантами при комплексной терапии ишемии головного мозга являются глутатион (GSH) и липоевая кислота (ЛК). Однако при попадании в организм (в кровоток) глутатион (GSH) и липоевая кислота (ЛК) связываются с белками, быстро биодеградируют, что приводит к уменьшению антиоксидантного и терапевтического действия. Период полувыведения GSH – 10 мин, ЛК – 25 мин. Кроме того липоевая кислота плохо растворима в воде.

Поэтому **целью данной работы** является получение наночастиц с глутатионом и ЛК, для пролонгированного действия, улучшения доставки этих антиоксидантов в головной мозг, а также изучение влияния полученных нанодисперсий на функциональную активность нейтрофилов и тромбоцитов.

Методом спонтанного эмульгирования были получены наночастицы с глутатионом, НЧ, содержащие совместно GSH и ЛК на основе фосфатидилхолина (ФХ) и плюроника Ф68 (Ф68) в фосфатном буфере (PBS, pH 7.4) с размером частиц от 40 до 330 нм, характеризующиеся эффективностью включения глутатиона 37±5% и ЛК 85±10% в НД и коллоидной стабильностью при комнатной температуре более 6 месяцев. Нанодисперсии с глутатионом на основе ФХ-Ф68 были гомогенными (индекс полидисперсности, PDI<0.3), наночастицы с глутатионом и ЛК на основе Ф68 были гетерогенными и содержали 2 фракции наночастиц: 50-90 нм (15-25%) и 272-330 нм (75-85%). Наноконструкции с глутатионом и липоевой кислотой были электронейтральными.

Затем оценивали кинетику высвобождения GSH и ЛК из нанодисперсий при помощи диффузионной ячейки Франца. Было обнаружено, из всех НЧ за 24 ч высвободилось не более 75±5% глутатиона и 45±5% ЛК, что позволяет судить о пролонгированном действии препарата (активных субстанций) и поддержание его терапевтической концентрации в крови.

Изменение функциональной активности нейтрофилов (НФ) определяет развитие и прогрессирование патологических процессов, происходящих в организме человека. Образование активных форм кислорода (АФК) в избыточных концентрациях приводит к резкому увеличению метаболической активности НФ и к их гибели. Поэтому исследовали влияние полученных наночастиц с антиоксидантами на свободно-радикальные процессы в нейтрофилах. В результате проведенных исследований было показано, что добавление нанодисперсий с глутатионом (1.9-3.9 мМ) и с глутатионом и ЛК (GSH 0.7-2.6 мМ, ЛК 0.5-2мМ) приводило к значительному уменьшению (примерно 10-40 раз) интенсивности хемилюминесценции, обусловленной протеканием свободно-радикальных процессов в НФ, активированных с помощью форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА), по сравнению с активированными клетками (НФ+ФМА). Было показано, что раствор глутатиона в PBS (2.7 мМ) обладает выраженным антиоксидантным эффектом на данной биологической модели.

На завершающем этапе работы оценивали влияние полученных наноконструкций с глутатионом и ЛК на агрегацию тромбоцитов (Тц), в плазме крови, взятой у здоровых доноров, методом оптической агрегатометрии. В качестве индуктора агрегации Тц использовали арахидоновую кислоту (АК). В результате исследований было показано, что НД с глутатионом (1.9-5.9 мМ) и с глутатионом и ЛК (GSH 1.3-2.6 мМ, ЛК 1-2 мМ) уменьшали степень (примерно на 45-80%) и скорость агрегации тромбоцитов, активированных с помощью АК. Антиоксидантное действие наночастиц оценивали по концентрации тиобарбиатурат активных продуктов (ТБК-АП)) в образцах обогащенной Тц плазмы (ОТП), инкубированными с АК. В результате исследований было выявлено, что в процессе агрегации Тц, обусловленной АК, происходит окисление липидов в ОТП. При этом, добавление нанодисперсий, содержащих GSH и GSH и липоевую кислоту совместно, к образцам плазмы крови приводило к значительному уменьшению концентрации ТБК-АП (в 2.5-6 раз) с учетом вклада окисленных белков и белок-липидных комплексов в плазме. Необходимо отметить, что наиболее эффективным антиоксидантным действием обладают наночастицы, содержащие совместно две активные субстанции (GSH+ЛК, подавление содержания продуктов ПОЛ в 5.5-6 раз). Кроме того, было показано, что нанодисперсии без антиоксидантов и водные растворы GSH и ЛК незначительно влияли на образование продуктов ПОЛ в плазме при активации тромбоцитов с помощью арахидоновой кислоты.

Вероятнее всего данный результат свидетельствует о лучшем проникновением НЧ с антиоксидантами внутрь клеток по сравнению с водными растворами.

На основании полученных результатов можно сделать заключение о том, что полученные нанодисперсии с GSH и ЛК обладают значительными антиоксидантными антиагрегационными свойствами по сравнению с водными растворами GSH и ЛК и являются перспективными препаратами для дальнейших исследований *in vivo*.

Работа выполнена в рамках государственных заданий № 122051600109-5 (РНИМУ им. Н.И. Пирогова) и 122041900109-3 (ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН), а также при поддержке Фонда развития теоретической физики и математики “Базис” (грант № 22-1-1-28-1).

Литература

1. *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. – 67-492.*

2. *Shchelkonogov V.A., Inshakova A.M. et.al.Nanoparticles of lipoic acid esters: preparation andantioxidant effect // Mend. Commun. – 2021. – V. 31. – P. 507508.*

UDC 577.352.2, 577.35 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-46-49

ANTIOXIDANT AND ANTIPLATELET PROPERTIES OF NANOPARTICLES WITH GLUTATHIONE AND LIPOIC ACID

V.A. Shchelkonogov[1,2,3], A.M. Inshakova[1], E.S. Darnotuk[1], N.A. Surikov[1], A.Yu. Evstratova[1], O.A. Baranova[2], A.V. Chekanov[2], K.D. Kazarinov[3], N.S. Shastina[1], E.Yu. Solov’eva[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] Kotel’nikov Institute of Radio Engineering and Electronics of the Russian Academy of Sciences, pl. Vvedenskogo 1, Fryazino, 141120 Russia

Nanoparticles (NPs) with glutathione (GSH) and lipoic acid (LA) with a particle size of 40 to 330 nm were obtained, characterized by an efficiency encapsulation (EE) of glutathione 37 ± 5% and LA 85 ± 10% in nanodispersions (NDs), their slow release from nanoconstructions and high colloidal stability during long-term storage at room temperature. It has been found that NPs with glutathione and LA have pronounced antioxidant and antiplatelet properties.

Key words: nanoparticles, glutathione, lipoic acid, neutrophils, free radicals, platelets.

Cerebrovascular diseases are among the most common forms of CNS pathology with a high rate of deaths [1]. The main pathogenetic mechanisms of ischemic stroke include: the onset and progression of oxidative stress, disorders of vascular-platelet and coagulation hemostasis, damage to the BBB, etc. [2]. Therapy for this pathology includes the use of drugs that exhibit an antioxidant effect, preventing platelet aggregation. The most promising antioxidants in the complex therapy of cerebral ischemia are glutathione (GSH) and lipoic acid (LA). However, when ingested (into the bloodstream), glutathione (GSH) and lipoic acid (LA) bind to proteins and quickly biodegrade, which leads to a decrease in the antioxidant and therapeutic effect. The half-life of GSH is 10 min, LA - 25 min. In addition, lipoic acid is poorly soluble in water.

Therefore, **the purpose of research work** is to obtain nanoparticles with glutathione and LA for a prolonged action, improve the delivery of these antioxidants to the brain, and study the effect of the obtained nanodispersions on the functional activity of neutrophils and platelets.

By spontaneous emulsification nanoparticles with glutathione, NPs containing GSH and LA together, based on phosphatidylcholine (PC) and Pluronic F68 (F68) in phosphate buffer (PBS, pH 7.4) with a particle size of 40 to 330 nm were obtained, characterized by efficiency inclusion of glutathione, 37±5% and LA 85±10% into NDs and colloidal stability at room temperature for more than 6 months. Nanoparticles with glutathione based on F68 were homogeneous (polydispersity index, PDI<0.3), nanoparticles with glutathione and LA based on F68 were heterogeneous and contained 2 fractions of nanoparticles: 50–90 nm (15–25%) and 272–330 nm (75-85%). Nanoconstructions with glutathione and lipoic acid were electroneutral.

Then, the kinetics of the release of GSH and LA from the nanodispersions was evaluated using the Franz diffusion cell. It was found that no more than 75 ± 5% of glutathione and 45 ± 5% of LA were released from all NPs in 24 hours, which makes it possible to judge the prolonged action of the drug (active substances) and the maintenance of its therapeutic concentration in the blood.

The change in the functional activity of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) determines the development and progression of pathological processes occurring in the human body. The formation of reactive oxygen species (ROS) in excess concentrations leads to a sharp increase in the metabolic activity of PMNs and to their death. Therefore, we studied the effect of the nanoparticles with antioxidants on free radical processes in neutrophils. As a result of the studies, it was shown that the addition of nanodispersions with glutathione (1.9-3.9 mM) and with glutathione and LA (GSH 0.7-2.6 mM, LA 0.5-2 mM) led to a significant decrease (about 10-40 times) in the intensity of chemiluminescence due to the occurrence of free radical processes in PMNs activated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) compared to activated cells (PMNs+PMA). It was revealed that the solution of glutathione in PBS (2.7 mM) has a pronounced antioxidant effect in this biological model.

At the final stage of the work, the effect of the nanoconstructions with glutathione and LA on platelet (Pt) aggregation in blood plasma, taken from healthy donors, was evaluated by the method of optical aggregatometry. Arachidonic acid (AA) was used as an inducer of Pt aggregation. As the result of studies, it was found that NDs with glutathione (1.9-5.9 mM) and with glutathione and LA (GSH 1.3-2.6 mM, LA 1-2 mM) together reduced the degree (approximately 45-80%) and the rate of aggregation of platelets activated by AA.The antioxidant effect of nanoparticles was assessed by the concentration of thiobarbiaturate active products (TBA-AP) in platelet-rich plasma (PRP) samples incubated with AA. As a result of the reaearch, it was revealed that in the process of aggregation of Pt, caused by AA, lipid oxidation occurs in PRP. At the same time, the addition of nanodispersions containing GSH and GSH with lipoic acid to blood plasma samples led to a significant decrease in the concentration of TBA-AP (by 2.5-6 times), taking into account the contribution of oxidized proteins and protein-lipid complexes in plasma. It should be noted that nanoparticles containing two active substances together (GSH+LA, suppression of the content of lipid peroxidation products by 5.5-6 times) have the most effective antioxidant effect. In addition, it was shown that nanodispersions without antioxidants and aqueous solutions of GSH and LA had little effect on the formation of lipid peroxidation products in plasma during platelet activation by arachidonic acid. Most likely, this result indicates a better penetration of NPs with antioxidants into cells compared to aqueous solutions.

Based on the obtained results, it can be concluded that the prepared nanodispersions with GSH and LA have significant antioxidant and antiplatelet properties in comparison with an aqueous solution of GSH and LA and are promising drugs for further studies *in vivo*.

This work was performed within the State Assignments, Registration № 122051600109-5 (Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov) and Registration № 122041900109-3 (IRE V.A. Kotelnikov RAS) and with the support of the Foundation for the Development of Theoretical Physics and Mathematics "Basis" (grant № 22-1-1-28-1).

References

1. *S. Akiba, S. Matsugo, L. Packer, T. Konishi. Assay of protein-bound lipoic acid in tissues by a new enzymatic method // Anal Biochem. –1998. –V. 258, № 2. – P. 299-304.*

2. *Shchelkonogov V.A., Inshakova A.M. et.al.Nanoparticles of lipoic acid esters: preparation andantioxidant effect // Mend. Commun. – 2021. – V. 31. – P. 507508.*

УДК 615.456 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-49-51

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ В-ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА САЙТ СВЯЗЫВАНИЯ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА С ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

Якупова Л.Р., Бежанидзе Е.З., Копнова Т.Ю., Скуредина А.А., Кудряшова Е.В.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии
119991, Россия, г. Москва ул. Ленинские Горы, д. 1, стр. 3
e-mail: Yakupova.Linara9@gmail.com

Синтезированы и охарактеризованы полимерные носители для лекарственных молекул на основе производных β-циклодекстрина с различными сшивающими агентами. Исследовано влияние данных полимеров на процесс комплексообразования препарата левофлоксацина с человеческим сывороточным альбумином. Изучены эффективность взаимодействия и сайт связывания антибактериальной молекулы в белке.

Ключевые слова: левофлоксацин, человеческий сывороточный альбумин, системы доставки, β-циклодекстрин.

Левофлоксацин (ЛВ) – антибактериальный препарат широкого спектра действия, относящийся к группе фторхинолонов [1]. Применение ЛВ в клинической практике ограничено рядом недостатков, таких как низкая растворимость и биодоступность, высокая токсичность и вероятность возникновения побочных эффектов. Улучшить характеристики антибактериального средства можно путем разработки систем доставки. Перспективными носителями являются производные β-циклодекстрина, в частности гидроксипропил-β-циклодекстрин (ГПЦД). В современных реалиях используются полимеры на их основе, что позволяет разрабатывать мультифункциональные системы доставки, отвечающие требованиям современной фармацевтики. При изучении новой лекарственной формы важно учитывать ее поведение в кровотоке, а также параметры взаимодействия с основным белком плазмы – человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) [2]. Данная работа посвящена разработке систем доставок ЛВ и изучению влияния полимерных носителей циклодекстрина на связывание ЧСА с ЛВ в зависимости от молекулярной архитектуры полимера. Синтез полимерных носителей на основе ГПЦД проводился с различными сшивающими агентами: лимонной кислотой (ЛК) и 1,6-гексаметилендиизоционатом (ГМД), в качестве мономера использовался ГПЦД и комплекс ГПЦД-ЛВ.

Установлено, что взаимодействие лекарственных форм с ЧСА приводит к снижению интенсивности эмиссии белка (340 нм) с увеличением концентрации ЛВ (pH 7,4; 37 ºC). Комплексообразование ЛВ с ГПЦД снижает эффективность взаимодействия ЛВ с ЧСА, что может быть обусловлено удерживанием антибактериальной молекулы в гидрофобной полости ГПЦД (Таблица 1). Напротив, использование полимерных носителей в качестве лигандов примерно в 2 раза увеличивает связывание ЛВ с ЧСА, по-видимому, из-за дополнительных взаимодействий частиц с поверхностью белка. При этом не изменяется сайт связывания ЛВ, что было показано с помощью двух маркеров: напроксена и бромфенолового синего. Инкапсулирование ЛВ в матрицу полимеров почти полностью препятствует взаимодействию ЛВ с ЧСА, вероятно из-за прочного связывания ЛВ внутри носителя. Полученные данные открывают широкие возможности для создания лекарственной формуляции ЛВ с контролируемой кинетикой высвобождения.

Таблица 1. **Значения $K_{ШФ}$ и $K_{Св}$ для систем (Носитель-ЛВ)-ЧСА, pH = 7,4, 37 °C.**

Носитель	КШФ, $М^{-1}$	КСв, $М^{-1}$
–	$3,4(\pm0,2) \times 10^4$	$9,9(\pm0,3) \times 10^5$
ГПЦД	$3,3(\pm0,1) \times 10^4$	$3,5(\pm0,1) \times 10^5$
ГПЦД-ЛК	$7,7(\pm0,4) \times 10^4$	$9,4(\pm0,4) \times 10^5$
ГПЦД-ГМД	$9,8(\pm0,4) \times 10^4$	$7,0(\pm0,3) \times 10^6$

Работа выполнена в рамках реализации гранта РНФ 22-24-00604, с использованием оборудования (ИК-спектрометр и КД-спектрометр) по программе развития МГУ.

Литература:

1. Davis R., Bryson H. Review of Levofloxacin // Drug Evaluation. 1994. V. 47. P. 677 – 700.

2. Fanali G., Di Masi A., Trezza V. Human serum albumin: From bench to bedside// Molecular Aspects of Medicine. 2012 V. 33 P. 209-290.

UDC 615.456 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-49-51

THE EFFECT OF B-CYCLODEXTRIN DERIVATIVES ON THE BINDING SITE AND THE EFFECTIVENESS OF LEVOFLOXACIN INTERACTION WITH HUMAN SERUM ALBUMIN

L.R. Yakupova, E.Z. Bezhanidze, T.Yu. Kopnova, A.A. Skuredina, E.V. Kudryashova

Lomonosov Moscow State University, faculty of chemistry, department of chemical enzymology
119991, Russia, Moscow, Leninskie Gory, str. 1
e-mail: Yakupova.Linara9@gmail.com

Polymer carriers for medicinal molecules based on β-cyclodextrin derivatives with various crosslinking agents were synthesized and characterized. The effect of these polymers on the process of complexation of levofloxacin with human serum albumin has been studied. The interaction efficiency and binding site of an antibacterial molecule in a protein have been studied.

Keywords: levofloxacin, human serum albumin, delivery systems, β-cyclodextrin.

Levofloxacin (LV) is a broad–spectrum antibacterial drug, it belongs to the group of fluoroquinolones [1]. The use of LV in clinical practice is limited by a number of disadvantages, such as low solubility and bioavailability, high toxicity and the likelihood of side effects. It is possible to improve the characteristics of an antibacterial agent by developing delivery systems. Derivatives of β-cyclodextrin are promising carriers, in particular hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPCD). In modern realities, polymers based on HPCD are used, which makes it possible to develop multifunctional delivery systems that meet the requirements of modern pharmaceuticals. For studying a new drug form, it is important to take into account its behavior in the bloodstream, as well as the parameters of interaction with the main plasma protein – human serum albumin (HSA) [2]. This work is devoted to the development of LV delivery systems and the study of the effect of cyclodextrin polymer carriers on the binding of HSA to LV depending on the molecular architecture of the polymer. The synthesis of polymer carriers based on HPCD was carried out with various crosslinking agents: citric acid (CA) and 1,6-hexamethylenediisocionate (HMD), HPCD and the HPCD-LV complex were used as a monomer.

It was found that the interaction of drug forms with HSA leads to a decrease in the intensity of protein emission (340 nm) with an increase in the concentration of LV (pH 7,4; 37 ºC. The complexation of LV with HPCD reduces the effectiveness of the interaction of LV with HSA, which may be due to the retention of an antibacterial molecule in the hydrophobic cavity of the HPCD (Table 1). On the contrary, the use of polymer carriers as ligands increases the binding of LV to HSA about 2 times, apparently due to additional interactions of particles with the protein surface. At the same time, the LV binding site does not change, which was shown using two markers: naproxen and bromophenol blue. The encapsulation of LV in the polymer matrix almost completely prevents the interaction of LV with HSA, probably due to the strong binding of LV inside the carrier. The obtained data open up wide possibilities for creating a drug formulation of LV with controlled release kinetics.

Table 1. Values of K_{SV} and K_b for systems (Carrier-LV)-HSA, pH = 7,4, 37°C.

Carrier	KSV, M^{-1}	Kb, M^{-1}
–	$3,4(\pm0,2) \times 10^4$	$9,9(\pm0,3) \times 10^5$
HPCD	$3,3(\pm0,1) \times 10^4$	$3,5(\pm0,1) \times 10^5$
HPCD-CA	$7,7(\pm0,4) \times 10^4$	$9,4(\pm0,4) \times 10^5$
HPCD-HMD	$9,8(\pm0,4) \times 10^4$	$7,0(\pm0,3) \times 10^6$

The work was carried out within the framework of the RGNF grant 22-24-00604, using equipment (IR spectrometer and CD spectrometer) under the MSU development program.

References

1. Davis R., Bryson H. Review of Levofloxacin // Drug Evaluation. 1994. V. 47. P. 677 – 700.

2. Fanali G., Di Masi A., Trezza V. Human serum albumin: From bench to bedside// Molecular Aspects of Medicine. 2012 V. 33 P. 209-290.

ЦИФРОВОЙ БИОДИЗАЙН И ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЕ

DIGITAL BIODESIGN AND PERSONALISED HEALTHCARE

1. ПЕРСПЕКТИВЫ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА ДВУМЕРНЫХ КУЛЬТУР ХОНДРОЦИТОВ И КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ
Агафонова Л.Е., Вахрушев И.В., Новикова В.Д., Ярыгин К.Н., Шумянцева В.В. 56

PROSPECTS OF ELECTROCHEMICAL METHODS FOR THE COMPARATIVE ANALYSIS OF TWO-DIMENSIONAL CULTURES OF CHONDROCITES AND CELL SPHEROIDS
L.E. Agafonova, I.V. Vakhrushev, V.D. Novikova, K.N. Yarygin, V.V. Shumyantseva 57

2. МИЗОЛАКРОН – НОВЕЙШИЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ АГЕНТ
Золотцев В.А., Латышева А.С., Решетникова А.Е., Мишарин А.Ю. 58

MIZOLACRON – THE NEWEST ANTICANCER AGENT
V.A. Zolottsev, A.S. Latysheva, A.E. Reshetnikova, A.Yu. Misharin 59

3. ЦИФРОВАЯ ПАТОЛОГИЯ В ДИАГНОСТИКЕ И СТАДИРОВАНИИ РАКА ПРОСТАТЫ. СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР И МЕТА-АНАЛИЗ
Морозов А.О., Тараткин М.С., Базаркин А.К., Rivas J.G., Puliatti S., Checcucci E., Belenchon I.R., Kowalewski K-F, Шпикина А.С., Singla N., Teoh J.Y.C, Козлов В.В., Rodler S., Piazza P., Fajkovic H., Abreu A.L., Cacciamani G.E., Еникеев Д.В. 59

ARTIFICIAL INTELLIGENCE APPLICATION AND PERFORMANCE IN PROSTATE CANCER IDENTIFICATION AND GRADING. SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS
A. Morozov, M. Taratkin, A. Bazarkin, J.G. Rivas, S. Puliatti, E. Checcucci, I.R. Belenchon, K.-F. Kowalewski, A. Shpikina, N. Singla, J.Y. C. Teoh, V. Kozlov, S. Rodler, P. Piazza, H. Fajkovic, A.L. Abreu, G.E. Cacciamani, D. Enikeev 60

4. «БИОВИТРИНА»: ВКЛАД В СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД К ПЛАНИРОВАНИЮ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
Букреева А.С., Мальсагова К.А., Кайшева А.Л. 61

"BIOVITRINE": A CONTRIBUTION TO A MODERN APPROACH TO RESEARCH PLANNING
A.S. Bukreeva, K.A. Malsagova, A.L. Kaisheva 62

5. СТРАТЕГИЯ УВЕЛИЧЕНИЯ СУПРЕССОРНОЙ АКТИВНОСТИ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ ТЕРАПИИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
Жданов Д.Д., Блинова В.Г., Гладилина Ю.А., Абрамова А.А., Елисеева Д.Д. 62

STRATEGY FOR INCREASING THE SUPPRESSIVE ACTIVITY OF REGULATORY T CELLS TO CREATE A PERSONALIZED CELL PRODUCT FOR THE REGENERATIVE THERAPY OF AUTOIMMUNE DISEASES
D.D. Zhdanov, V.G. Blinova, Y.A. Gladilina, A.A. Abramova, D.D. Eliseeva 63

6. КОМПЬЮТЕРНЫЙ ПОИСК ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА, СВЯЗАННЫХ С ТЯЖЕСТЬЮ COVID-19,
ПРИ ПОМОЩИ АНАЛИЗА ГЕНОМНЫХ И ТРАНСКРИПТОМНЫХ ДАННЫХ
Иванов С.М., Тарасова О.А., Лагунин А.А., Поройков В.В. 64

COMPUTER SEARCH FOR HUMAN GENES ASSOCIATED WITH SEVERITY OF COVID-19
USING AN ANALYSIS OF GENOMICS AND TRANSCRIPTOMICS DATA
S.M. Ivanov, O.A. Tarasova, A.A. Lagunin, V.V. Poroikov 65

7. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ОБКЛАДОЧНЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ
В ТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА
Карсунцева Е.К., Воронова А.Д., Степанова О.В., Чадин А.В., Шишкина В.В.,
Андрецова С.С., Фурса Г.А., Шпорт С.В., Решетов И.В., Чехонин В.П. 66

PERSPECTIVES FOR THE APPLICATION OF ENSHEATHING CELLS OF THE OLFACTORY MUCOSA
IN THE THERAPY OF EXPERIMENTAL ALZHEIMER'S DISEASE
E.K. Karsuntseva, A.D. Voronova, O.V. Stepanova, A.V. Chadin, V.V. Shishkina,
S.S. Andretsova, G.A. Fursa, S.V. Shport, I.V. Reshetov, V.P. Chekhonin....67

8. ПОДХОДЫ К ПОВЫШЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭЛЕКТРОКАТАЛИЗА ЦИТОХРОМА P450 3A4
Королёва П.И., Шумянцева В.В. 68

APPROACHES TO INCREASING EFFICIENCY OF CYTOCHROME P450 3A4 ELECTROCATALYSIS
P.I. Koroleva, V.V. Shumyantseva....69

9. ФОСФОЛИПИДНАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДОКСОРУБИЦИНА С NGR ПЕПТИДОМ:
ПУТЬ ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
Кострюкова Л.В., Терешкина Ю.А., Гисина А.М. 70

PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF DOXORUBICIN WITH NGR PEPTIDE:
THE PATH OF TUMOR CELL DEATH
L.V. Kostryukova, Yu.A. Tereshkina, A.M. Gisina....72

10. МОДЕЛИРОВАНИЕ IN VITRO И IN SILICO МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА
РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРА РАКОВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК CD133
Лупатов А.Ю, Ким Я.С, Гисина А.М, Холоденко И.В, Курбатов Л.К,
Копылов А.Т., Тихонова О.В., Згода В.Г., Ярыгин К.Н. 73

IN VITRO AND IN SILICO MODELING OF THE MOLECULAR REGULATION
MECHANISM OF THE CANCER STEM CELL MARKER CD133 EXPRESSION
A.Yu. Lupatov, Y.S. Kim, A.M. Gisina, I.V. Kholodenko, L.K. Kurbatov,
A.T. Kopylov, O.V. Tikhonova, V.G. Zgoda, K.N. Yarygin 74

11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ПРОФИЛЯ СПОРТСМЕНА
ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ УПРАЖНЕНИЙ ВЫСОКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ
Мальсагова К.А., Степанов А.А., Копылов А.Т., Кайшева А.Л. 75

MOLECULAR PROFILING OF ATHLETES PERFORMING
HIGH-INTENSITY EXERCISES IN EXTREME ENVIRONMENTS
K.A. Malsagova, A.A. Stepanov, A.T. Kopylov, A.L. Kaysheva 76

12. ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ
И ПОИСК АССОЦИИРОВАННЫХ С НИМИ ФАКТОРОВ РАЗВИТИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
О.А. Тарасова, С.М. Иванов, В.В. Поройков....77

AN ANALYSIS OF IMMUNE RESPONSE REGULATION IN VIRAL INFECTIONS
AND SEARCH FOR FACTORS OF CANCER DEVELOPMENT
O.A. Tarasova, S.M. Ivanov, V.V. Poroikov....78

13. ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ АКТИВАЦИИ TLR3 В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА НА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА
Толстова Т.В., Кожин П.М., Доценко Е.Д., Ромашин Д.Д., Русанов А.Л., Лузгина Н.Г. 79

EFFECT OF TLR3 ACTIVATION CONDITIONS IN HUMAN MESENCHIMAL
STROMAL CELLS ON IMMUNOMODULATORY PROPERTIES
T.V. Tolstova, P.M. Kozhin, E.D. Dotsenko, D.D. Romashin, A.L. Rusanov, N.G. Luzgina 80

14. ПЕРСПЕКТИВЫ МЕТАБОЛОМНОЙ ДИАГНОСТИКИ:
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ МЕТАБОГРАММА КРОВИ
Трифонова О.П., Балашова Е.Е., Маслов Д.Л., Лохов П.Г., Арчаков А.И. 81

FUTURE PERSPECTIVES OF METABOLOMICS DIAGNOSTICS:
MASS SPECTOMETRIC BLOOD METABOGRAM
O.P. Trifonova, E.E. Balashova, D.L. Maslov, P.G. Lokhov, A.I. Archakov 82

15. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ БИОСЕНСОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ
Филиппова Т.А., Масамрех Р.А., Шумянцева В.В., Фарафонова Т.Е., Мошковский С.А., Кузиков А.В. 82

ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR DETERMINING THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF ENZYMES
T.A. Filippova, R.A. Masamrekh, V.V. Shumyantseva, T.E. Farafonova, S.A. Moshkovskii, A.V. Kuzikov 83

16. "МЕТАБОСКАН" – СИСТЕМА ДИАГНОСТИКИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ
И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ МЕТАБОЛОМНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ
Шестакова К.М., Москалева Н.Е., Апполонова С.А. 84

"METABOSCAN" – A DIAGNOSTIC SYSTEM FOR CARDIOVASCULAR
AND ONCOLOGICAL DISEASES BASED ON METABOLOMIC PROFILING
K.M. Shestakova, N.E. Moskaleva, S.A. Appolonova 85

УДК 544.6.018.2 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-56-58

ПЕРСПЕКТИВЫ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА ДВУМЕРНЫХ КУЛЬТУР ХОНДРОЦИТОВ И КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ

Агафонова Л.Е., Вахрушев И.В., Новикова В.Д., Ярыгин К.Н., Шумянцева В.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Россия
119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8
e-mail: agafonovaluba@mail.ru

Электрохимическое профилирование продемонстрировало существенные различия в свойствах первичных хондроцитов, культивированных в виде трехмерных клеточных сфероидов по сравнению с их двумерными адгезивными культурами. Результаты работы могут служить основой для создания метода оценки биологических характеристик клеточных сфероидов, применимого для выявления накопления экстрацеллюлярного матрикса и степени дифференцировки клеток в их составе.

Ключевые слова: клеточные сфероиды; in vitro модели; электроанализ, печатные графитовые электроды.

В последнее время в качестве модельных тканеинженерных конструкций при проведении биомедицинских исследований in vitro все чаще применяются трехмерные сферические агрегаты клеток, называемые сфероидами. В сфероидах клетки получают возможность образовывать межклеточные контакты и накапливать собственный экстрацеллюлярный матрикс. При таком способе культивирования клетки находятся в значительно более близким к естественным условиям, чем в двумерных культурах. Это способствует повышению их жизнеспособности и наиболее полному раскрытию специфических функциональных качеств. По этой причине клеточные сфероиды являются очень перспективным модельным объектом, как для изучения свойств самих клеток, так и для оценки действия на них всевозможных агентов.

В настоящей работе методом циклической вольтамперометрии (ЦВА) и дифференциально-импульсной вольтамперометрии (ДИВА) на графитовых электродах, получаемых методом трафаретной печати («печатные электроды»), модифицированных одностеночными углеродными нанотрубками (1мг/мл), были исследованы первичные хондроциты человека, культивированные как в виде трехмерных сфероидов, так и традиционным способом в виде двумерных адгезивных культур. ЦВА при скорости сканирования 50 мВ/с показали наличие пика электроокисления при потенциале (0,604 ± 0,007) В в обоих случаях. ДИВА в более узком диапазоне потенциалов от 0,2 до 1,2 В (Рисунок 1) для двумерных культур содержит один пик при потенциале (0,559 ± 0,010) В, что, скорее всего, соответствует электрохимическому окислению экспонированных аминокислот (Tyr, Trp, Cys) мембранных белков клеток. При ДИВА анализах сфероидов регистрировался также второй пик электроокисления при потенциале (0,864 ± 0,010) В, который может соответствовать электроокислению белков и других биомолекул межклеточного матрикса. При повторном сканировании пики уменьшались вплоть до полного исчезновения, что говорит о необратимом процессе электроокисления.

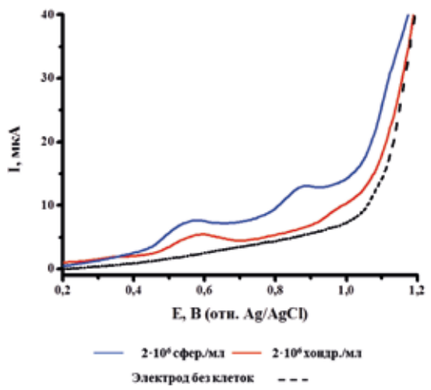

Рисунок 1. ДИВА сфероидов (синяя кривая) и двумерных культур хондроцитов (красная кривая) при концентрации 2·10⁶ клеток/мл.

Электрохимические профили (Рисунок 1) продемонстрировали существенные различия в свойствах клеточных сфероидов на основе первичных хондроцитов по сравнению с их двумерными культурами, что вероятнее всего, объясняется более интенсивной продукцией клетками компонентов экстрацеллюлярного матрикса в трехмерных условиях.

Работа выполнена в рамках проекта по созданию и развитию научных центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение No 075-15-2022-305).

UDC 544.6.018.2 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-56-58

PROSPECTS OF ELECTROCHEMICAL METHODS FOR THE COMPARATIVE ANALYSIS OF TWO-DIMENSIONAL CULTURES OF CHONDROCITES AND CELL SPHEROIDS

L.E. Agafonova, I.V. Vakhrushev, V.D. Novikova, K.N. Yarygin, V.V. Shumyantseva

Institute of Biomedical Chemistry (IBMC)
Pogodinskaya St. 10/8, 119121 Moscow, Russia
e-mail: agafonovaluba@mail.ru

Electrochemical profiling demonstrated significant differences in the properties of primary chondrocytes cultured as 3D cell spheroids in comparison with their 2D adhesive cultures. The results of this work can serve as a basis for the development of a method for assessing the biological characteristics of cellular spheroids, applicable to detecting the accumulation of the extracellular matrix and the degree of cell differentiation in their composition.

Keywords: cellular spheroids; in vitro models; electroanalysis, screen printed electrodes.

Recently, three-dimensional spherical aggregates of cells, called spheroids, are increasingly used as model tissue engineering structures in biomedical research in vitro. In spheroids, cells get the opportunity to form intercellular contacts and accumulate their own extracellular matrix. With this method of cultivation, the cells are in much closer to natural conditions than in two-dimensional cultures. Such approach helps to increase their viability and the most complete disclosure of specific functional qualities. For this reason, cellular spheroids are a very promising model object, both for studying the properties of cells themselves and for evaluating the effect of various agents on them.

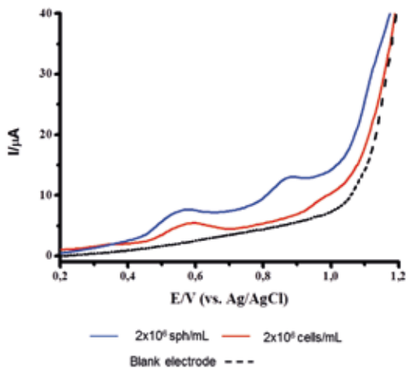

Figure 1. DPVs of spheroids (blue curve) and two-dimensional cultures of chondrocytes (red curve) at a concentration of 2·10⁶ cells/mL.

In this work, primary human chondrocytes cultured as in the form of three-dimensional spheroids, and in the traditional way in the form of two-dimensional adhesive cultures were investigated by cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) on the surface of graphite-based screen printed electrodes modified with single-walled carbon nanotubes (1mg/mL). CVs at a scan rate of 50 mV/s showed the presence of an electrooxidation peaks at a potential of (0.604 ± 0.007) V in both cases. DPV in a narrower potential range from 0.2 to 1.2 V (Figure 1) for two-dimensional cultures demonstrates one peak at a potential of (0.559 ± 0.010) V, which most likely corresponds

to the electrochemical oxidation of exposed amino acids (Tyr, Trp, Cys) membrane proteins of cells. DPV analyzes of spheroids revealed the second electrooxidation peak at a potential of (0.864 ± 0.010) V, which may correspond to the electrooxidation of extracellular matrix proteins and biomolecules. During repeated scanning, the peaks decreased until they completely disappeared, which indicates an irreversible process of electrooxidation.

Electrochemical profiles (Figure 1) showed significant differences in the properties of cellular spheroids based on primary chondrocytes in comparison with their two-dimensional cultures, which is probably due to the more intensive production of extracellular matrix components by cells under three-dimensional conditions.

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 075-15-2022-305).

УДК 542.06 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-58-59

МИЗОЛАКРОН – НОВЕЙШИЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ АГЕНТ

Золотцев В.А., Латышева А.С., Решетникова А.Е., Мишарин А.Ю.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Россия
119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8
e-mail: vazolottsev@mail.ru

Производные стероидов, модифицированные азотсодержащим циклом обладают способностью подавлять основные ферменты стероидогенеза и снижать рост и пролиферацию опухолевых клеток. Соединение-кандидат мизолакрон показало свою способность связываться в активном центре цитохрома P45017A1, являющегося ключевым ферментом стероидогенеза, что было подтверждено экспериментом в модельной системе, содержащей этот фермент. Кроме того, мизолакрон обладал значительной антипролиферативной активностью в отношении клеток карциномы простаты LNCaP и PC-3, что говорит о его высоком фармакологическом потенциале в качестве противоракового средства.

Ключевые слова: противоопухолевые агенты, стероиды, апоптоз, рак предстательной железы

Производные стероидов андростанового и прегнанового рядов, модифицированные азотсодержащим гетероциклом в кольце D, являются наиболее перспективными в качестве средств для лечения рака предстательной железы (РПЖ). Соединения, относящиеся к этой группе стероидов, эффективно снижают уровень андрогенов в плазме крови, подавляют рост и пролиферацию опухолевых клеток и ингибируют белки, занимающие центральное место в метаболических путях клеток РПЖ.

Коллективом лаборатории СФАС ИБМХ была синтезирована серия оксазолиновых производных андростана и прегнана по методу, ранее разработанному в лаборатории, проведён скрининг, на основании которого выбрано наиболее перспективное соединение-кандидат – мизолакрон.

При помощи методов компьютерного моделирования было установлено, что стероидный фрагмент синтезированного соединения позиционируется в активном центре цитохрома P450 17A1 (CYP17A1) аналогично известному ингибитору абиратерону, а гетероатом оксазолинового заместителя входит в координационную сферу железа гема, что говорит о высоком ингибиторном потенциале соединения.

В экспериментах *in vitro* мизолакрон подавлял пролиферацию и рост как андроген-зависимых, так и андроген-независимых культур клеток РПЖ (LNCaP и PC-3соотвественно), при этом в 7 раз превосходил таковые эффекты абиратерона на клетках линии PC-3 и не обладал острой цитотоксичностью. Проапоптатическая активность мизолакрона в этих клетках так же значительно превосходила абиратерон уже в малых концентрациях.

Ингибирование CYP17A1 в модельной системе продемонстрировало, что мизолакрон обладает высокой ингибиторной активностью, так же превосходя референсные соединения и практически полностью подавляя работу фермента.

Таким образом, мизолакрон обладает потенциалом в качестве нового препарата для лечения рака простаты и заслуживает внимания для рассмотрения его в качестве кандидата для дальнейших предклинических и клинических исследований.

Работа выполнена в рамках проекта по созданию и развитию научных центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение No 075-15-2022-305).

UDC 542.06 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-58-59

MIZOLACRON – THE NEWEST ANTICANCER AGENT

V.A. Zolottsev, A.S. Latysheva, A.E. Reshetnikova, A.Yu. Misharin

Institute of Biomedical Chemistry (IBMC)
Pogodinskaya St. 10/8, 119121 Moscow, Russia
e-mail: vazolottsev@mail.ru

Steroid derivatives modified with nitrogen containing heterocycles are known to inhibit activity of steroidogenic enzymes, decrease proliferation of cancer cells and attract attention as promising anticancer agents. The candidate compound mizolacron was shown to bind to the active site of cytochrome P45017A1, a key enzyme in steroidogenesis, which was confirmed by experiment in a model system containing this enzyme. In addition, mizolacron had significant antiproliferative activity against LNCaP and PC-3 prostate carcinoma cells, indicating its high pharmacological potential as an anticancer agent.

Keywords: anticancer agents, steroids, apoptosis, prostate cancer

Androstane and pregnane derivatives modified at ring D with nitrogen containing heterocycles are the most promising as a means for the treatment of prostate cancer (PC). Compounds belonging to this group of steroids effectively reduce the plasma level of androgens, inhibit the proliferation of tumor cells, and inhibit proteins that occupy a main role in the pathways of tumor cells.

The team of the IBMC SFAS laboratory synthesized a series of oxazoline derivatives of androstane according to the method previously developed in the laboratory. Biological screening was carried out, on the basis of which the most promising candidate compound, mizolacron, was selected.

Using computer simulation methods, was found that the steroid fragment of the synthesized compound is positioned in the active center of cytochrome P450 17A1 (CYP17A1) similarly to the known inhibitor abiraterone. Oxazoline cycle of compound was positioned in the vicinity of heme plane in such a way for heme iron to be able to form coordination bond with oxazoline nitrogen, which indicates a high inhibitory potential of the compound.

In *in vitro* experiments, mizolacron inhibited the proliferation and growth of both androgen-dependent and androgen-independent PCa cell cultures (LNCaP and PC-3, respectively), while being 7 times superior to those of abiraterone on PC-3 cells and did not have acute toxicity. The proapoptotic activity of mizolacron in these cells was also significantly superior to that of abiraterone even at low concentrations.

Inhibition of CYP17A1 in a model system demonstrated that mizolacron has a high inhibitory activity, also surpassing the reference compounds and almost completely inhibiting the activity of the enzyme.

Thus, mizolacron has potential as a new drug for the treatment of prostate cancer and deserves attention to be considered as a candidate for further preclinical and clinical studies.

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 075-15-2022-305).

УДК 616-006.66 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-59-61

ЦИФРОВАЯ ПАТОЛОГИЯ В ДИАГНОСТИКЕ И СТАДИРОВАНИИ РАКА ПРОСТАТЫ. СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР И МЕТА-АНАЛИЗ

Морозов А.О., Тараткин М.С., Базаркин А.К., Rivas J.G., Puliatti S., Checcucci E., Belenchon I.R., Kowalewski K-F, Шпикина А.С., Singla N., Teoh J.Y.C, Козлов В.В., Rodler S., Piazza P., Fajkovic H., Abreu A.L., Cacciamani G.E., Еникеев Д.В.

Young Academic Urologists (YAU) Working Group in Uro-technology of the European Association of Urology.*
Институт урологии и репродуктивного здоровья человека, Сеченовский университет, Москва, Россия;
119435, Москва, ул. Большая Пироговская, д. 2 с. 1; email: ak.bazarkin@gmail.com

Точность выявления и стадирования рака простаты с помощью ИИ сопоставима с оценками опытных патологоанатомов. При этом ИИ точнее дифференцирует доброкачественную ткань от злокачественной по сравнению с определинием степени злокачественности ткани по шкале Глисона

Ключевые слова: систематический обзор, мета-анализ, цифровая патология, балл по Глисону, рак простаты

Искусственный интеллект (ИИ) – перспективный инструмент анализа изображений в патологической анатомии, применяемый для диагностики, стадирования и классификации рака, а также для оценки прогноза у пациентов с онкологическими заболеваниями. Цель данного исследования – определить возможности применения ИИ в гистологической диагностике рака простаты. Мы провели систематический поиск литературы в трёх базах данных. Первичная конечная точка – точность ИИ в дифференцировании между раком и доброкачественной гиперплазией простаты. Вторичными конечными точками выбраны точность ИИ при определении степени злокачественности по Глисону и степень согласия между ИИ и патоморфологами. В количественный синтез включено 24 исследования, проведенных с 2007 по 2021 год, объединяющих данные более 8000 биопсий простаты и 458 радикальных простатэктомий. Систематический обзор отобранных статей показал, что чувствительность ИИ в отношении дифференциации доброкачественной ткани от рака простаты превышает 90% и колеблется от 87% до 100%, а специфичность – от 68% до 99%. Общая точность варьируется от 83,7% до 98,3%, AUC достигает 0,99. Мета-анализ с использованием метода Мантеля - Хензеля показал, что общая чувствительность достигает 0,96 (I^2 = 80,7%), а общая специфичность – 0,95 (I^2 =86,1%). Среднее отношение правдоподобия положительного результата (pooled positive LR) составляет 15,3 (I^2 =87,3%), отрицательного результата – 0,04 (I^2 =78,6%). AUC в кривой SROC (symmetric receiver operating characteristic) составляет 0,99. В отношении стадирования рака простаты по Глисону точность ИИ ниже: чувствительность ИИ для определения суммы баллов по Глисону варьируется от 77% до 87%, а специфичность – от 82 до 90%. Общая точность колеблется от 83,7% до 98,3%, AUC составляет 0,99. Коэффициент согласия каппа (к) между ИИ и патоморфологами значительно варьируется: от 0,3 до 0,83. Точность выявления и стадирования рака простаты с помощью ИИ сопоставима с оценками опытных патологоанатомов. ИИ – перспективный инструмент с широкой возможностью клинического применения, приводящий к ускорению и оптимизации постановки патологоанатомического диагноза. Внедрение ИИ в рутинную практику может быть ограничено сложностью, длительностью обучения и настройкой нейронной сети.

UDC 616-006.66 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-59-61

ARTIFICIAL INTELLIGENCE APPLICATION AND PERFORMANCE IN PROSTATE CANCER IDENTIFICATION AND GRADING. SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS

A. Morozov, M. Taratkin, A. Bazarkin, J.G. Rivas, S. Puliatti, E. Checcucci, I.R. Belenchon, K.-F. Kowalewski, A. Shpikina, N. Singla, J.Y. C. Teoh, V. Kozlov, S. Rodler, P. Piazza, H. Fajkovic, A.L. Abreu, G.E. Cacciamani, D. Enikeev

Young Academic Urologists (YAU) Working Group in Uro-technology of the European Association of Urology. Institute for Urology and Reproductive Health, Sechenov University, Moscow, Russia; 119435, Moscow, Bolshaya Pirogovskaya str., 2 building 1; e-mail: ak.bazarkin@gmail.com*

The accuracy of AI for PCa identification and grading is comparable to expert pathologists. In this case, AI more accurately differentiates benign tissue from malignant compared to the gradation of malignant tissue on the Gleason scale.

Keywords: systematic review, meta-analysis, digital pathology, Gleason score, prostate cancer.

Artificial intelligence (AI) is a promising tool in pathology, including cancer diagnosis, subtyping, grading, and prognostic prediction. The aim of the study is to assess AI application in prostate cancer (PCa) histology. We carried out a systematic literature search in 3 databases. Primary outcome was AI accuracy in differentiating between PCa and benign hyperplasia. Secondary outcomes were AI accuracy in determining Gleason grade and agreement among AI and pathologists. Our final sample consists of 24 studies conducted from 2007 to 2021. They aggregate data from roughly 8000 cases of prostate biopsy and 458 cases of radical prostatectomy (RP). A systematic review of selected articles showed that sensitivity for PCa diagnostic exceeded 90% and ranged from 87% to 100%, and specificity varied from 68% to 99%. Overall accuracy ranged from 83.7% to 98.3% with AUC reaching 0.99. The meta-analysis using the Mantel-Haenszel method showed pooled sensitivity of 0.96 with I^2 = 80.7% and pooled specificity of 0.95 with I^2 =86.1%. Pooled positive likehood ratio was 15.3 with I^2 =87.3% and negative – was 0.04 with I^2 =78.6%. SROC (symmetric receiver operating characteristics) curve represents AUC =0.99. For grading the accuracy of AI was lower: sensitivity for Gleason grading ranged from 77% to 87%, and specificity from 82% to 90%. Kappa-coefficient (к) of agreement between AI and pathologists differed widely from 0.3 to 0.83. The accuracy of AI for PCa identification and grading is comparable to expert pathologists. This is a promising approach which has several possible clinical applications resulting in expedite and optimize pathology reports. AI introduction into common practice may be limited by difficult and time-consuming convolutional neural network training and tuning.

УДК 621.039.75 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-61-62

«БИОВИТРИНА»: ВКЛАД В СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД К ПЛАНИРОВАНИЮ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Букреева А.С., Мальсагова К.А., Кайшева А.Л.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Россия, 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8. e-mail: 3385142@gmail.com

Веб-репозиторий биологических образцов “БиоВитрина” разработан с целью обеспечения исследователей биоматериалами разных типов и форматов, собранными законно, этично, с соблюдением стандартных требований по пробоподготовке и хранению, полноценно охарактеризованных, и ассоциированных с максимально возможным объемом клинических и экспериментальных данных.

Ключевые слова: биобанкинг, персонализированное здравоохранение, биологический материал

Формирование коллекций биологических образцов является актуальной задачей в рамках выполнения исследований в области развития науки, биобанкирования, биомедицины и т.д. Успешное развитие персонализированного подхода зависит от решения множества вопросов, связанных с эффективным использованием биологических образцов в научных и практических целях. Важность и крайняя необходимость развития биобанков возрастает с каждым годом, что отмечается как отечественным, так и мировым сообществом, подчеркивающих важную роль в развитии трансляционной медицины [1][2]. Биобанки позволяют достичь высокий уровень получения, транспортировки и хранения биологических образцов, с соблюдением всех норм и биоэтических стандартов. Помимо хранения биообразцов, удовлетворяющего определенным требованиям, задачей биобанков на сегодняшний день также становится обеспечение наиболее эффективной реализации биообразцов, в том числе выполнение широкого спектра исследований с их использованием. [3]

Целью создания веб-репозитория биологических образцов “БиоВитрина” является предоставление актуальной информации об имеющихся в коллекции биобанка образцах. При планировании эксперимента каждый исследователь сталкивается с задачей выбора клинического партнера и формированием выборки, отвечающей заданным критериям. Именно эту проблему способен решить веб-репозиторий “БиоВитрина”, предоставляя удобную возможность отбора биообразцов, при этом исследователю не требуется выполнять поиск клинического партнера и согласовывать условия взаимодействия. Помимо этого, исследователи могут ознакомиться с аналитическими данными биологических образцов, полученными ранее, тем самым, что позволит исключить дублирование экспериментальной работы и сэкономить ресурсы.

Таким образом, использование веб-репозитория биологических образцов “БиоВитрина” в планировании научных исследований открывает широкие перспективы для научного сообщества.

Работа выполнена в рамках проекта по созданию и развитию научных центров мирового уровня «Цифровой дизайн и персонализированное здравоохранение» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение No 075-15-2022-305).

Литература

1. *Zika E. et al. A European survey on biobanks: trends and issues //Public health genomics. – 2011. – Т. 14. – №. 2. – С. 96-103.*
2. *Копылова О.В., Ершова А.И., Ефимова И.А., Блохина А.В., Лимонова А.С., Борисова А.Л., ... & Драпкина О.М. (2022). Электронные истории болезни и биобанкирование. Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 21(11), 105-113.*
3. *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.*

UDC 621.039.75 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-61-62

"BIOVITRINE": A CONTRIBUTION TO A MODERN APPROACH TO RESEARCH PLANNING

A.S. Bukreeva, K.A. Malsagova, A.L. Kaisheva

The BioVitrina web-based biological sample repository is designed to provide researchers with biomaterial of different types and formats, collected legally, ethically, following standard requirements for sample preparation and storage, fully characterised, and associated with as much clinical and experimental data as possible.

Keywords: Biobanking, personalised healthcare, biological material

Collections of biological samples are an urgent task in the execution of research in the field of scientific development, biobanking, biomedicine, etc. Successful development of personalised approach depends on solving many issues related to effective use of biological samples for scientific and practical purposes. The importance and urgency of the development of biobanks is increasing every year, which is noted by both the domestic and international communities who emphasise their important role in the development of translational medicine [1][2]. Biobanks make it possible to achieve a high level of acquisition, transportation and storage of biological samples, in compliance with all norms and bioethical standards. In addition to storing biosamples to a certain standard, the challenge for biobanks today is also to ensure the most efficient sale of biosamples, including the execution of a wide range of research using them. [3]

The aim of the BioVitrine web repository of biological samples is to provide up-to-date information about the available samples in the Biobank collection. When planning an experiment, every researcher is faced with the task of selecting a clinical partner and generating a sample that meets the given criteria. The BioVitrina web repository solves this problem by providing a convenient way to select biosamples, without the need for the researcher to search for a clinical partner and negotiate the terms of collaboration. In addition, researchers can access the analytical data of biological samples obtained earlier, thereby eliminating the duplication of experimental work and saving resources.

Thus, the use of the BioVitrina web-based biological sample repository in research planning offers great promise for the scientific community.

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 75-15-2022-305).

References

1. *Zika E. et al. A European survey on biobanks: trends and issues //Public health genomics. – 2011. – T. 14. – №. 2. – C. 96-103.*
2. *Kopylova O.V., Ershova A.I., Efimova I.A., Blokhina A.V., Limonova A.S., Borisova A.L., ... & Drapkina O.M. (2022). Electronic case histories and biobanking. Cardiovascular Therapy and Prevention, 21(11), 105-113.*
3. *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. – T. 19. – №. 1. – C. 73-82.*

УДК 571.27 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-62-64

СТРАТЕГИЯ УВЕЛИЧЕНИЯ СУПРЕССОРНОЙ АКТИВНОСТИ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ ТЕРАПИИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Жданов Д.Д., Блинова В.Г., Гладилина Ю.А., Абрамова А.А., Елисеева Д.Д.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ) (ИБМХ), Москва, Россия
119121 ул. Погодинская, д. 10, стр.8
e-mail: zhdanovdd@mail.ru

Осуществлена модуляция альтернативного сплайсинга FoxP3 переключающими сплайсинг олигонуклеотидами. Подход позволяет получить регуляторные Т-клетки с увеличенной супрессорной активностью.

Ключевые слова: регуляторные Т-клетки, альтернативный сплайсинг, FoxP3, супрессорная активность.

Регуляторные Т клетки (Treг) контролируют иммунный ответ на аутоантигены и играют ключевую роль в развитии аутоиммунных заболеваний. У больных некоторыми аутоиммунными заболеваниями (боковой амиотрофический склероз (БАС), рассеянный склероз, синдром Шегрена, псориаз и др.) выявлено снижение количества Treг и/или нарушение их способности супрессировать аутоактивированные лимфоциты. Причины, по которым развиваются данные отклонения не изучены в полной мере. Транскрипционный фактор FoxP3 является «мастерным белком», регулирующим дифференццировку, созревание, а также интенсивность пролиферации и супрессорной активности Treг [1]. Альтернативный сплайсинг (АС), это вариант сплайсинга матричных РНК (мРНК), при котором в ходе экспрессии гена на основе одного и того же первичного транскрипта (пре-мРНК) возможно образование нескольких видов зрелых мРНК. Описано четыре изоформы белка FoxP3, образующихся в результате альтернативного сплайсинга его пре-мРНК: полноразмерный вариант, варианты с делецией каждого из экзонов 3 или 8, а также с делецией обоих экзонов. Роль сплайс-вариантов FoxP3 в регуляции функций Treг не изучена в полной мере [2]. В Treг периферической крови пациентов с БАС выявлено изменение экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 в сторону синтеза варианта с делецией экзона 3, по сравнению с Treг здоровых доноров, у которых превалирует полноразмерный вариант. Treг таких пациентов обладали пониженной супрессорной активностью. Из крови пациентов выделены Treг и культивированы *ex vivo* до терапевтических количеств. После культивирования Treг были трансфицированы переключающими сплайсинг олигонуклеотидами для индукции синтеза полноразмерного сплайс-варианта FoxP3. Данные специфичные олигонуклеотиды комплиментарны регуляторным последовательностям на цепи пре-мРНК FoxP3 (последовательностям, являющимися сайтами взаимодействия с регулирующими сплайсинг SR-белками). Таким образом осуществлена модуляция включения экзона 3 в мРНК FoxP3 и синтез полноразменого сплайс-варианта этого белка. Полученные клетки показали в три раза большую супрессорную активность, т.е. способность ингибировать аутологичные таргетные эффекторные $CD4^{+}CD25^{-}$ Т-лимфоциты. Пролиферативная активность, таких клеток была выше в 2 раза. Клетки синтезировали специфичные для Treг цитокины, гранзимы и супрессорные рецепторы на мембране более интенсивно, по сравнению с контрольными клетками. Таким образом, стратегия увеличения супрессорной активности Treг при помощи переключающих сплайсинг олигонуклеотидов применима к аутологичным Treг больных БАС. Нами создан прототип персонализированного клеточного терапевтического препарата для регенеративной терапии аутоиммунного заболевания.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00326, https://rscf.ru/project/23-24-00326/

Литература:

1. *Lifshitz G.V., Zhdanov D.D., Lokhonina A.V., Eliseeva D.D., Lyssuck L.Y., Zavalishin I.A., Bykovskaia S.N. Ex vivo expanded regulatory T cells CD4+CD25+FoxP3+CD127Low develop strong immunosuppressive activity in patients with remitting-relapsing multiple sclerosis // Autoimmunity, 2016. Vol. 49. P. 388-396.*
2. *Blinova V.G.; Novachly N.S.; Gippius S.N.; Hilal A.; Gladilina Y.A.; Eliseeva D.D.; Zhdanov D.D. Phenotypical and functional characteristics of human regulatory T cells during ex vivo maturation from CD4+ T Lymphocytes // Appl. Sci. 2021. Vol. 11. P. 5776.*

UDC 571.27 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-62-64

STRATEGY FOR INCREASING THE SUPPRESSIVE ACTIVITY OF REGULATORY T CELLS TO CREATE A PERSONALIZED CELL PRODUCT FOR THE REGENERATIVE THERAPY OF AUTOIMMUNE DISEASES

D.D. Zhdanov, V.G. Blinova, Y.A. Gladilina, A.A. Abramova, D.D. Eliseeva

Institute of Biomedical Chemistry (IBMC),
Pogodinskaya St. 10/8, 119121 Moscow, Russia
e-mail: zhdanovdd@mail.ru

Alternative splicing of FoxP3 was modulated by splicing-switching oligonucleotides. This approach makes it possible to obtain regulatory T cells with increased suppressive activity.

Keywords: regulatory T cells, alternative splicing, FoxP3, suppressive activity

Regulatory T cells (Tregs) control the immune response to autoantigens and play a key role in the development of autoimmune diseases. In patients with some autoimmune diseases (amyotrophic lateral sclerosis (ALS), multiple sclerosis, Sjögren's syndrome, psoriasis, etc.), a decrease in the amount of Tregs and/or their impaired ability to suppress autoactivated lymphocytes was revealed. The reasons for such changes are not fully understood. The transcription factor FoxP3 is a “master protein” that regulates the differentiation, maturation, proliferation rate and suppressive activity of Tregs [1]. Alternative splicing (AS) is a variant of messenger RNA (mRNA) splicing in which several types of mature mRNA can be formed during gene expression based on the same primary transcript (pre-mRNA). Four isoforms of the FoxP3 protein resulting from alternative splicing of its pre-mRNA have been described: a full-length variant, variants with a deletion of each of exons 3 or 8, and variants with a deletion of both exons. The role of FoxP3 splice variants in the regulation of Treg functions has not been fully determined [2]. In Tregs derived from the peripheral blood of patients with ALS, a change in the expression of FoxP3 splice variants toward the synthesis of a variant with exon 3 deletion was revealed compared with Tregs of healthy donors, in which the full-length variant predominates. Tregs of these patients had reduced suppressive activity. They were isolated from the blood of patients and cultured *ex vivo* to therapeutic amounts. After cultivation, Tregs were transfected with splicing-switching oligonucleotides to induce synthesis of the full-length FoxP3 splice variant. These specific oligonucleotides are complementary to the regulatory sequences on the FoxP3 pre-mRNA chain (sequences that are interaction sites for splicing-regulating SR proteins). Thus, modulation of exon 3 inclusion into FoxP3 mRNA and the synthesis of a full-length splice variant of this protein were performed. The resulting cells showed threefold higher suppressive activity, i.e., ability to inhibit autologous target effector $CD4^+CD25^-$ T-lymphocytes. The proliferative activity of such cells was 2 times higher. Cells synthesized Treg-specific cytokines, granzymes, and suppressor receptors on the membrane more intensively than control cells. Thus, the strategy of increasing Treg suppressive activity using splicing-switching oligonucleotides is applicable to autologous Tregs in ALS patients. We have created a prototype of a personalized cellular therapeutic drug for the regenerative therapy of autoimmune disease.

Funding: The research was carried out for the grant of the Russian Science Foundation No. 23-24-00326, https://rscf.ru/project/23-24-00326/

References

1. *Lifshitz G.V., Zhdanov D.D., Lokhonina A.V., Eliseeva D.D., Lyssuck L.Y., Zavalishin I.A., Bykovskaia S.N. Ex vivo expanded regulatory T cells CD4+CD25+FoxP3+CD127Low develop strong immunosuppressive activity in patients with remitting-relapsing multiple sclerosis // Autoimmunity, 2016. Vol. 49. P. 388-396.*
2. *Blinova V.G., Novachly N.S., Gippius S.N., Hilal A., Gladilina Y.A., Eliseeva D.D., Zhdanov D.D. Phenotypical and functional characteristics of human regulatory T cells during ex vivo maturation from CD4+ T Lymphocyte// Appl. Sci. 2021. Vol. 11. P. 5776.*

УДК 571.27 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-64-66

КОМПЬЮТЕРНЫЙ ПОИСК ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА, СВЯЗАННЫХ С ТЯЖЕСТЬЮ COVID-19, ПРИ ПОМОЩИ АНАЛИЗА ГЕНОМНЫХ И ТРАНСКРИПТОМНЫХ ДАННЫХ

Иванов С.М., Тарасова О.А., Лагунин А.А., Поройков В.В.

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия
119121, Москва, Погодинская ул., д. 10, стр. 8
e-mail: smivanov7@gmail.com

На основе сочетанного анализа геномных и транскриптомных данных были идентифицированы 105 генов, изменение экспрессии которых может приводить к развитию более тяжелых форм COVID-19. Многие из 105 генов являются мастер-регуляторами и регулируют свою собственную транскрипцию в клетках крови и легких. Белки, кодируемые 105 генами, регулируют врожденный и адаптивный иммунные ответы, а также связаны с клеточным транспортом, функционированием митохондрий, транскрипцией, сплайсингом и трансляцией белков в клетке.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция; COVID-19; тяжесть инфекционного заболевания; геномика; транскриптомика; мастер-регуляторы

Тяжесть клинических проявлений COVID-19 в основном определяется индивидуальными особенностями пациентов, включая генетические полиморфизмы [1]. Целью данной работы являлась идентификация генов человека, изменение функции которых влияет на тяжесть клинических проявлений коронавирусной инфекции. Для этого был выполнен сочетанный анализ геномных и транскриптомных данных с использованием различных методов биоинформатики.

На основе анализа общедоступных данных из COVID-19 host genetics initiative (https://www.covid19hg.org/) было идентифицировано 3625 однонуклеотидных полиморфизмов, коррелирующих со степенью тяжести COVID-19.

С использованием инструмента Variant Effect Predictor (https://www.ensembl.org/Tools/VEP) и данных по локусам количественных признаков (https://genetics.opentargets.org/) были идентифицированы полиморфизмы, ассоциированные как с аминокислотными заменами, так и с изменением транскрипции генов. Идентифицированные 3625 полиморфизмов были таким образом ассоциированы со 105 генами. Большая часть полиморфизмов предположительно влияет на связывание транскрипционных факторов в энхансерах и промотерах генов и связана с изменением уровня их транскрипции в разных органах и тканях. Мы выполнили анализ профилей транскрипции в различных клетках крови и легких, полученных от пациентов с разной степенью тяжести COVID-19 и доступных в базе данных GEO (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/). В результаты было обнаружено, что транскрипция 105 генов меняется по-разному в зависимости от степени тяжести COVID-19.

При помощи платформы Genome Enhancer [2] (https://ge.genexplain.com/) нами были идентифицированы транскрипционные факторы и их комплексы, связывание которых с регуляторными участками предположительно вызывает изменение транскрипции 105 генов при COVID-19. На основе полученной информации были также идентифицированы мастер-регуляторы – белки на вершине сигнальной сети, ответственные за изменение активности транскрипционных факторов и наблюдаемое изменение транскрипции генов. Мы обнаружили, что многие из 105 генов являются мастер-регуляторами и влияют на свою собственную транскрипцию. Эти гены предположительно кодируют наиболее важные, ключевые белки, изменение функций которых определяет развитие более тяжелых форм COVID-19. Это белки, регулирующие врожденный и адаптивный иммунные ответы, включая интерфероны, интерлейкины, хемокины и их рецепторы, а также белки сигнальных путей, белки, связанные с клеточным транспортом, функционированием митохондрий, транскрипцией, сплайсингом и трансляцией. Идентифицированные в рамках данной работы гены и белки могут служить основой для разработки подходов к терапии тяжелых форм COVID-19, и, возможно, других вирусных инфекций.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№ 122030100170-6).

Литература:

1. *Ishak A. et al. The association of COVID-19 severity and susceptibility and genetic risk factors: A systematic review of the literature//Gene. 2022. Vol. 836. 146674.*
2. *Kel A. et al. Walking pathways with positive feedback loops reveal DNA methylation biomarkers of colorectal cancer// BMC Bioinformatics. 2019. Vol. 20. Suppl. 4. 119.*

UDC 571.27 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-64-66

COMPUTER SEARCH FOR HUMAN GENES ASSOCIATED WITH SEVERITY OF COVID-19 USING AN ANALYSIS OF GENOMICS AND TRANSCRIPTOMICS DATA

S.M. Ivanov, O.A. Tarasova, A.A. Lagunin, V.V. Poroikov

Institute of biomedical chemistry, Moscow, Russia
119121, Moscow, Pogodinskaya Street, 10
e-mail: smivanov7@gmail.com

We identified 105 genes whose expression changes can lead to the development of more severe forms of COVID-19 based on the combined analysis of genomics and transcriptomics data, were identified. Many of the 105 genes

are master regulators and regulate their own transcription in blood and lung cells. Proteins encoded by 105 genes regulate innate and adaptive immune responses, and are also associated with cellular transport, mitochondrial function, transcription, splicing, and translation of proteins in the cell.

Keywords: coronavirus infection; COVID-19; infectious disease severity; genomics; transcriptomics; master-regulators

The severity of COVID-19 is mainly determined by the individual characteristics of patients, including genetic polymorphisms [1]. The aim of this work was to identify human genes associated with the severity of coronavirus infection. A combined analysis of genomic and transcriptomic data was performed for this purpose using various bioinformatics methods.

An analysis of publicly available data from the COVID-19 host genetics initiative (https://www.covid19hg.org/) allowed identifying 3625 single nucleotide polymorphisms that were associated with the severity of COVID-19.

Application of Variant Effect Predictor tool (https://www.ensembl.org/Tools/VEP) and analysis of data on quantitative trait loci (https://genetics.opentargets.org/) allowed revealing polymorphisms associated with both amino acid substitutions and changes in gene transcription. As a result, the identified 3625 polymorphisms were mapped to 105 genes. Most of the polymorphisms presumably affect the binding of transcription factors in enhancers and promoters of genes and are associated with changes in their transcription in different organs and tissues. We performed an analysis of transcription profiles in various blood and lung cells obtained from patients with different severity of COVID-19 and available in the GEO database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/). As a result, we found that the transcription of 105 genes was differently changed depending on the severity of COVID-19.

Using the Genome Enhancer platform [2] (https://ge.genexplain.com/), we identified transcription factors and their complexes, whose binding to regulatory regions presumably causes changes in the transcription of 105 genes during COVID-19. Based on the information obtained, we also identified master regulators, which are the proteins at the top of the signaling network responsible for the changing of transcription factors' activity and the observed changes in gene transcription. We found that many of the 105 genes are master regulators and regulate their own transcription. These genes presumably encode the most important proteins, so the changing of their functions determines the development of more severe forms of COVID-19. They include proteins that regulate innate and adaptive immune responses, e.g., interferons, interleukins, chemokines and their receptors, as well as proteins of signaling pathways, proteins associated with cell transport, mitochondrial functions, transcription, splicing and translation. The genes and proteins identified in this work can serve as the basis for developing approaches for the treatment of severe forms of COVID-19, and possibly other viral infections.

The study was performed in the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021-2030) (project No. 122030100170-6).

References

1. *Ishak A. et al. The association of COVID-19 severity and susceptibility and genetic risk factors: A systematic review of the literature//Gene. 2022. Vol. 836. 146674.*
2. *Kel A. et al. Walking pathways with positive feedback loops reveal DNA methylation biomarkers of colorectal cancer// BMC Bioinformatics. 2019. Vol. 20. Suppl. 4. 119.*

УДК 57.084.1 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-66-68

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ОБКЛАДОЧНЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ В ТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Карсунцева Е.К., Воронова А.Д., Степанова О.В., Чадин А.В., Шишкина В.В., Андрецова С.С., Фурса Г.А., Шпорт С.В., Решетов И.В., Чехонин В.П.

ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России
119034, г. Москва, Кропоткинский пер., д. 23
katya.karsunceva@gmail.com

Было проведено экспериментальное моделирование болезни Альцгеймера на самцах крыс. С помощью поведенческих тестов признаки развития заболевания были выявлены через 8 недель после введения бета-амилоида. На этом сроке в оба полушария головного мозга была проведена трансплантация обкладочных клеток обонятельной выстилки и впервые оценена их выживаемость.

Ключевые слова: клеточная терапия; моделирование болезни Альцгеймера; бета-амилоид; обкладочные клетки обонятельной выстилки.

Болезнь Альцгеймера (БА) является актуальной проблемой современной медицины, нейробиологии и психологии. В результате БА наступает выраженная атрофия нервной ткани головного мозга и начинаются когнитивные нарушения [1]. Перспективной стратегией лечения может быть клеточная терапия. Трансплантированные клетки могут способствовать нейрорегенерации, активируя восстановление баланса нейротрофических факторов, а также рост и ремиелинизацию поврежденных аксонов [2]. С точки зрения персонализированного подхода к терапии БА перспективным может быть применение аутологичных обкладочных клеток обонятельной выстилки носа. Получение этих клеток безопасно для пациента. Кроме того, эффективность этих клеток уже показана в экспериментальных работах и клинических исследованиях при травмах спинного мозга [3]. Однако, нет данных о применении обкладочных клеток при БА. Остается неизученным и вопрос о выживаемости этих клеток после их трансплантации в головной мозг.

Целью данной работы было изучить выживаемость обкладочных клеток обонятельной выстилки и оценить перспективы их применения для терапии экспериментальной БА.

В данной работе обкладочные клетки были получены из обонятельной выстилки крыс по разработанным нами протоколам [3]. Моделирование БА проводили на половозрелых самцах крыс линии Вистар (n=18) в возрасте 4 месяцев весом 300 грамм. Пептид бета-амилоида Aβ1-42 вводили стереотаксически в оба полушария гиппокампа крысы в зону CA1. Все манипуляции выполняли при обезболивании животных смесью золетила-100 и ксилазина. Оценку изменения когнитивных показателей проводили с помощью поведенческих тестов – «открытое поле» и водный лабиринт Морриса. Для изучения выживаемости меченые прижизненным мембранным красителем PKH26 обкладочные клетки были трансплантированы животным в оба полушария головного мозга (по 750 тыс.) в зону гиппокампа CA1. Визуальную оценку выживаемости проводили через 4 недели после трансплантации.

С помощью поведенческих тестов было показано, что через 8 недель после введения бета- амилоида у крыс наблюдается значимое ухудшение памяти и способности к обучению. Этот срок был выбран для клеточной трансплантации. Было показано, что после трансплантации клетки выживают в течение 4 недель, кроме того наблюдается их миграция в близлежащие зоны белого вещества. Выживаемость и способность к миграции данных клеток является важным фактором для успешной клеточной терапии экспериментальной БА, а в дальнейшем и для персонализированной терапии пациентов с БА.

Работа поддержана грантом РНФ № 22-1500141.

Литература:

1. *Barage S.H., Sonawane K.D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease // Neuropeptides. 2015. Vol. 52. P. 1-18.*
2. *Stepanova O.V., Voronova A.D. et al. Isolation of Rat Olfactory Ensheathing Cells and Their Use in the Therapy of Posttraumatic Cysts of the Spinal Cord // Bull. Exp. Biol. Med. 2018. Vol. 165. № 1. P. 132-135.*
3. *Stepanova O.V., Voronova A.D. et al. Efficiency of human olfactory ensheathing cell transplantation into spinal cysts to improve mobility of the hind limbs // Stem Cells Dev. 2019. V. 28. № 18. P. 1253-1263.*

UDC 57.084.1 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-66-68

PERSPECTIVES FOR THE APPLICATION OF ENSHEATHING CELLS OF THE OLFACTORY MUCOSA IN THE THERAPY OF EXPERIMENTAL ALZHEIMER'S DISEASE

E.K. Karsuntseva, A.D. Voronova, O.V. Stepanova, A.V. Chadin, V.V. Shishkina, S.S. Andretsova, G.A. Fursa, S.V. Shport, I.V. Reshetov, V.P. Chekhonin

V.P. Serbsky National Medical Research Center for Psychiatry and Narcology, Moscow
119034, Moscow, Kropotkinsky lane, 23
katya.karsunceva@gmail.com

Experimental modeling of Alzheimer's disease was performed in male rats. With the help of behavioral tests, signs of disease development were detected eight weeks after the introduction of beta-amyloid. At this time, ensheathing

cells of the olfactory mucosa were transplanted into both hemispheres of the brain, and their survival was assessed for the first time.

Keywords: cell therapy; modeling of Alzheimer's disease; beta amyloid; ensheathing cells of the olfactory mucosa.

Alzheimer's disease (AD) is a major problem in modern medicine, neurobiology, and psychology. As a result of AD, pronounced atrophy of the brain's nervous tissue occurs, and cognitive impairment begins [1]. Therefore, cellular therapy may be promising treatment strategy. Transplanted cells can promote neuroregeneration by restoring the balance of neurotrophic factors and the growth and remyelination of damaged axons [2]. From the perspective of a personalized approach to AD therapy, the use of autologous ensheathing cells of the olfactory mucosa of the nose may be promising. Receiving these cells is safe for patients. In addition, the effectiveness of these cells has already been demonstrated in experimental and clinical studies of spinal cord injuries [3]. However, there are no data regarding the use of ensheathing cells in AD. The survival of these cells after their transplantation into the brain remains unexplored.

The aim of this work was to study the survival of ensheathing cells of the olfactory mucosa and to assess the prospects for their use in the treatment of experimental AD.

Ensheathing cells were obtained from the olfactory mucosa of rats according to our protocols [3]. Modeling of AD was carried out on mature male Wistar rats (n=18) at the age of 4 months, weighing 300 g. The beta-amyloid peptide Aβ1-42 was stereotaxically injected into both hemispheres of the rat hippocampus in the CA1 zone. All manipulations were performed while the animals were anesthetized with a mixture of Zoletil-100 and xylazine. The assessment of changes in cognitive performance was carried out using behavioral tests - "open field" and the Morris water maze. To study survival, ensheathing cells labeled with the intravital membrane dye PKH26 were transplanted into animals in both hemispheres of the brain (750,000 each) in the hippocampal zone CA1. A visual assessment of survival was performed 4 weeks after transplantation.

Using behavioral tests, it was shown that eight weeks after the introduction of beta-amyloid in rats, there was a significant deterioration in memory and learning ability. This period was chosen for the cell transplantation. Cells have been shown to survive for up to four weeks after transplantation and migrate to nearby areas of white matter. The survival and migration ability of these cells are important factors for successful cell therapy of experimental AD and for personalized therapy of patients with AD.

This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 22-1500141).

References

1. *Barage S.H., Sonawane K.D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease // Neuropeptides. 2015. Vol. 52. P. 1-18.*
2. *Stepanova O.V., Voronova A.D. et al. Isolation of Rat Olfactory Ensheathing Cells and Their Use in the Therapy of Posttraumatic Cysts of the Spinal Cord // Bull. Exp. Biol. Med. 2018. Vol. 165. № 1. P. 132-135.*
3. *Stepanova O.V., Voronova A.D. et al. Efficiency of human olfactory ensheathing cell transplantation into spinal cysts to improve mobility of the hind limbs // Stem Cells Dev. 2019. V. 28. № 18. P. 1253-1263.*

УДК 577.15.08 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-68-70

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», 119121, Россия, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8
email: polinakoroleva1996@gmail.com

В качестве подхода к повышению эффективности электрокаталитических свойств цитохрома P450 3A4 был разработан метод включения фермента в мембраноподобное окружение, образованное липидоподобным веществом дидодецилдиметиаммоний бромидом и мембранным белком стрептолизином О. Увеличение каталитической активности цитохрома P450 3A4 достигало 197 %, по сравнению с системой без использования стрептолизина О.

Ключевые слова: цитохром P450 3A4, стрептолизин О, электрохимический анализ, эритромицин.

Цитохромы P450 – семейство ферментов, содержащих в качестве простетической группы гем типа b, обнаруженные во всех классах живых организмов, отвечающие за биотрансформацию как эндогенных, так и экзогенных соединений. Число типов реакций, катализируемых цитохромами P450 крайне разнообразно, что делает эти ферменты крайне привлекательными для использования в качестве биосинтетических катализаторов. Электрохимические методы показали себя как эффективные инструменты при исследовании каталитических и кинетических параметром цитохромов P450. Основным преимуществом электрохимических систем по сравнению с реконструированными системами для исследования цитохромов P450 является отсутствие необходимости использования белков редокс-партнеров и кофакторов, таких как НАД(Ф)Н, для сложного каталитического цикла цитохрома P450, поскольку источником электронов является непосредственно электрод. Ранее нами было разработано несколько подходов к повышению эффективности электрокатализа, основанных на механизме многостадийного каталитического цикла цитохрома P450, таких как образование продуктивного фермент-субстратного комплекса до стадии присоединения электронов, а также использование флавиновых нуклеотидов как кофакторов редуктаз [1]. Однако, наиболее перспективным на данный момент подходом является включение фермента в упорядоченные поры, образованные как неорганическими веществами (анодный оксид алюминия), так и белковыми порообразующими структурами (стрептолизин О). Переход от 2D поверхности планарного электрода к 3D объемной структуре нанопор и наноканалов, способствует увеличению стабильности фермента, и снижает его денатурацию [2,3].

Разработан метод модификации печатного графитового электрода (ПГЭ) позволяющий создать мембраноподобное окружение для фермента, сходное по свойствам с окружением цитохрома P450 в клетке и моделирующее структурные краудинг-эффекты. Для этого было использовано липидоподобное вещество дидодецилдиметиаммоний бромид (ДДАБ), образующее на поверхности электрода пленку, схожую по структуре с биологическими мембранами, а также мембранный белок стрептолизин О (SLO). Для исследования эффективности повышения электрокатализа была исследована система с цитохромом P450 3A4 и его субстратом, макролидным антибиотиком эритромицином, подвергающемуся реакции цитохром P450 3A4–зависимого N-деметилирования. Регистрацию каталитической активности проводили по накоплению одного из продуктов реакции - формальдегида, спектрофотометрически.

Использование данного подхода позволило повысить эффективность электрокатализа цитохрома P450 3A4 в реакции N-деметилирования эритромицина со 100 ± 22% для системы ПГЭ/ДДАБ/CYP3A4 и 297 ± 7% для ПГЭ/ДДАБ/SLO/CYP3A4. Каталитический ток, являющийся адекватным отражением эффективности катализа, также возрастал, $I_{cat\ max}$ = 8.69±0.94×10^{-8} А и $I_{cat\ max}$ = 15.8±1.7×10^{-8} А, соответственно.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00064, https://rscf.ru/project/23-25-00064

Литература:

1. *Shumyantseva V.V., et al. Approaches for increasing the electrocatalitic efficiency of cytochrome P450 3A4// Bioelectrochemistry. 2023.Vol. 149. 108277.*
2. *Shumyantseva V.V., et al. Enzymology on an Electrode and in a Nanopore: Analysis Algorithms, Enzyme Kinetics, and Perspectives// BioNanoScience. 2022. Vol. 12. P.1341-1355.*
3. *Shumyantseva V.V., et al. Increasing the Efficiency of Cytochrome P450 3A4 Electrocatalysis Using Electrode Modification with Spatially Ordered Anodic Aluminum Oxide-Based Nanostructures for Investigation of Metabolic Transformations of Drugs, Doklady Biochemistry and Biophysics. 2022. Vol. 506. P. 215-219.*

UDC 577.15.08 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-68-70

APPROACHES TO INCREASING EFFICIENCY OF CYTOCHROME P450 3A4 ELECTROCATALYSIS

P.I. Koroleva, V.V. Shumyantseva

Institute of Biomedical Chemistry
119121, Russia, Moscow, Pogodinskaya str, 10, building 8
email: polinakoroleva1996@gmail.com

As an approach for increasing electrocatalytic properties of cytochrome P450 3A4 method for incorporating an enzyme into a membrane-like environment formed by the lipid-like substance didodecyldimethiammonium bromide and the membrane protein streptolysin O. was developed The increase in the catalytic activity of cytochrome P450 3A4 reached 197% compared to system without the use of streptolysin O.

Key words: cytochrome P450 3A4, streptolysin O, electrochemical analysis, erythromycin.

Cytochromes P450 are family of enzymes contained heme type b as a prosthetic group, discovered in all kingdoms of living organisms, responsible for biotransformation both endogenous and exogenous compounds. The types of reactions catalyzed by cytochromes P450 are extremely diverse, which makes these enzymes attractive for use as biosynthetic catalysts. Electrochemical methods have shown themselves to be effective tools in the study of catalytic and kinetic parameters of P450 cytochromes. The main advantage of electrochemical systems compared to reconstructed systems for the study of cytochrome P450 is the absence of the need to use redox partner proteins and cofactors, such as NAD(P)H, for the complex catalytic cycle of cytochrome P450, since the electrode itself is the source of electrons. Previously, we have developed several approaches to increase the efficiency of electrocatalysis based on the mechanism of the multistage catalytic cycle of cytochrome P450, such as the formation of a effective enzyme-substrate complex before the electron addition stage, as well as the use of flavin nucleotides as reductase cofactors [1]. However, the most promising approach at the moment is the inclusion of the enzyme in ordered pores formed both by inorganic substances (anodic alumina) and protein pore-forming structures (streptolysin O). The transition from the 2D surface of a planar electrode to the 3D bulk structure of nanopores and nanochannels increases the stability of the enzyme and reduces its denaturation [2, 3].

A method for modifying a screen-printed electrode (SPE) has been developed, which makes it possible to create a membrane-like environment for the enzyme, similar in properties to the cytochrome P450 environment in the cell and simulating structural crowding effects. For this, the lipid-like substance didodecyldimethiammonium bromide (DDAB) was used, which forms a film on the electrode surface similar in structure to biological membranes, as well as the membrane protein streptolysin O (SLO). To study the efficiency of increasing electrocatalysis, we studied a system with cytochrome P450 3A4 and its substrate, the macrolide antibiotic erythromycin, which undergoes the reaction of cytochrome P450 3A4-dependent N-demethylation. Registration of catalytic activity was carried out spectrophotometrically by the accumulation of one of the reaction products - formaldehyde.

The use of this approach made it possible to increase the efficiency of electrocatalysis of cytochrome P450 3A4 in the reaction of N-demethylation of erythromycin from 100 ± 22% for the SPE/DDAB/CYP3A4 system and 297 ± 7% for SPE/DDAB/SLO/CYP3A4. The catalytic current, which is an adequate reflection of the efficiency of catalysis, also increased, $I_{cat\ max}$ = 8.69±0.94×10^{-8} A and $I_{cat\ max}$ = 15.8±1.7×10^{-8} A, respectively.

This research was carried out at the expense of the Russian Science Foundation grant (RSF). No. 23-25-00064 https://rscf.ru/en/project/23-25-00064/.

References

1. *Shumyantseva V.V., et al. Approaches for increasing the electrocatalitic efficiency of cytochrome P450 3A4// Bioelectrochemistry. 2023.Vol. 149. 108277.*
2. *Shumyantseva V.V., et al. Enzymology on an Electrode and in a Nanopore: Analysis Algorithms, Enzyme Kinetics, and Perspectives// BioNanoScience. 2022. Vol. 12. P.1341-1355.*
3. *Shumyantseva V.V., et al. Increasing the Efficiency of Cytochrome P450 3A4 Electrocatalysis Using Electrode Modification with Spatially Ordered Anodic Aluminum Oxide-Based Nanostructures for Investigation of Metabolic Transformations of Drugs, Doklady Biochemistry and Biophysics. 2022. Vol. 506. P. 215-219.*

УДК 625.277.3 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-70-73

ФОСФОЛИПИДНАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДОКСОРУБИЦИНА С NGR ПЕПТИДОМ: ПУТЬ ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Кострюкова Л.В., Терешкина Ю.А., Гисина А.М.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича" (ИБМХ), Москва, 119121, Погодинская ул., д.10, стр.7
kostryukova87@gmail.com

При включении доксорубицина в фосфолипидные наночастицы с адресным фрагментом (NGR-пептидом) происходило повышение его проникновения в опухолевые клетки (CD13+). Оценка клеточной гибели показала увеличение клеток, подверженных апоптозу. Данная композиция является перспективной для лечения онкологических заболеваний.

Ключевые слова: Фосфолипидные наночастицы, таргетная система доставки, доксорубицин, апоптоз, in vitro

Онкология – одно из распространенных заболеваний в мире и занимает второе место после сердечно-сосудистых заболеваний. Химиотерапия – это один из широко применяемых методов лечения рака. Одним из используемых препаратов является антибиотик антрациклинового ряда – доксорубицин (Dox). Однако его применение ограничено рядом его побочных проявлений (в частности, дозозависимая кардиотоксичность, лекарственная устойчивость и др.), связанных с неспецифическим распределением Dox в организме. Одним из методов решения данной проблемы является снабжение лекарства таргетными системами транспорта. Перспективными векторными молекулами (лигандами) выступают пептиды, содержащие последовательность трех аминокислот – Asn-Gly-Arg (NGR), рецептором для которых является аминопептидаза N/CD13. Данный рецептор повышено экспрессируется на поверхности ряда опухолевых клеток и кровеносных сосудов опухоли. Ранее в ИБМХ была разработана композиция Dox, встроенного в фосфолипидные наночастицы (НЧ), показавшая большую степень эффективности по сравнению со свободной формой [1]. С целью придания направленного действия фосфолипидная композиция Dox была снабжена адресным вектором (NGR пептидом) [2]. Для понимания некоторых аспектов механизма действия разработанной композиции и оценки безопасности нами были проведена серия экспериментов по исследованию пути гибели опухолевых клеток. Оценку проводили на линии клеток HT-1080 (CD13+). Клетки инкубировали с образцами Dox в течении 24ч и далее анализировали с помощью набора определения апоптотических клеток с помощью аннексина V-AF 488. На рисунке 1 представлены данные, полученные с помощью проточного цитометра FACSAria III и обработанные на программном обеспечении FlowJ version 10.

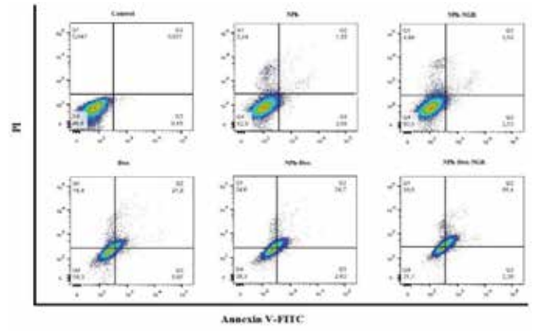

Рисунок 1 Анализ апоптоза в культуре клеток HT-1080, инкубированных с фосфолипидными НЧ (NPh), фосфолипидными НЧ с адресным пептидом (NPh-NGR), доксорубцином; фосфолипидной композицией NPh-Dox; фосфолипидной композицией с пептидом NPh-Dox-NGR. Концентрации по Dox 2μM.

Результаты показали, что гибель опухолевых клеток наблюдалась в основном по пути апоптоза. При этом для фосфолипидных композиций без доксорубицина (NPh) и без доксорубицина с адресным пептидом (NPh-NGR) была отмечена незначительная гибель клеток (около 8%). При инкубации клеток с доксорубицином, встроенным в фосфолипидные наночастицы с адресным фрагментом NRG (NPh-Dox-NGR), в большей степени наблюдалась гибель клеток по пути позднего апоптоза, процент клеток был в 2 раза выше по сравнению со свободной формой (55,4 и 27,8 %, соответственно).

Таким образом, изучение пути гибели клеток при инкубации с фосфолипидной композицией Dox, снабженной адресным фрагментом NRG, а также с отдельными компонентами данной композиции показало, что во всех вариантах гибель клеток происходила преимущественно по пути апоптоза.

Работа выполнена в рамках проекта по созданию и развитию научных центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение No 075-15-2022-305)

Литература

1. *Немцова Е.Р. и др. Доклиническое изучение фармакологических свойств препарата "Доксорубицин-НФ" // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 169. – № 6. – С. 720-726.*
2. *Кострюкова Л.В. и др. Система адресной доставки для доксорубицина на основе специфического пептида и фосфолипидных наночастиц // Биомед. Хим. – 2020. – Т. 66. – № 6. – С. 464-468*

UDC 625.277.3 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-70-73

PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF DOXORUBICIN WITH NGR PEPTIDE: THE PATH OF TUMOR CELL DEATH

L.V. Kostryukova, Yu.A. Tereshkina, A.M. Gisina

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121, Pogodinskaya st., 10, bld. 7
kostryukova87@gmail.com

When doxorubicin was incorporated into phospholipid nanoparticles with an addressable fragment (NGR-peptide), its penetration into tumor cells (CD13+) increased. Assessment of cell death showed an increase in cells susceptible to apoptosis. This composition is promising for the treatment of oncological diseases.
Keywords: Phospholipid nanoparticles, targeted delivery system, doxorubicin, apoptosis, in vitro

Oncology is one of the most common diseases in the world and ranks second after cardiovascular diseases. Chemotherapy is one of the widely used methods of cancer treatment, the most widely used an anthracycline antibiotic is doxorubicin (Dox). However, its use is limited by a number of its side effects (dose-dependent cardiotoxicity, drug resistance, etc.) associated with the nonspecific distribution of Dox in the body. One of the methods of solving this problem is the delivery of drugs with targeted transport systems. Promising vector molecules (ligands) are peptides containing a sequence of three amino acids – Asn-Gly-Arg (NGR), the receptor for which is aminopeptidase N/CD13. This receptor is overexpressed on the surface of many tumor cells and blood vessels of the tumor.

IBMH employees had previously developed a composition of Dox embedded in phospholipid nanoparticles (NP), which showed a greater degree of efficiency compared to the free form [1]. In order to provide the phospholipid composition of Dox with a targeted action, a directed vector (NGR peptide) was attached to it [2]. In order to understand some aspects of the mechanism of action of the developed composition and to assess safety, we conducted a series of experiments to investigate the pathway of tumor cell death, we used HT-1080 cell lines (CD13+). The cells were incubated with Dox samples for 24 hours and then analyzed using an apoptotic cell detection kit using annexin V-AF 488. Figure 1 shows the data obtained using the FACSAria III flow cytometer and processed using the FlowJ version 10 software.

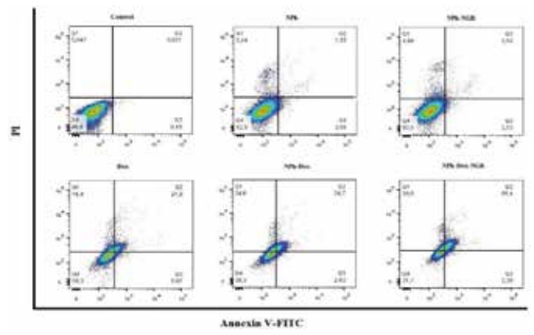

Figure 1. Analysis of apoptosis in HT-1080 cell culture incubated with phospholipid NP (NPh), phospholipid NP with targeted peptide (NPh-NGR), doxorubicin; phospholipid composition NPh-Dox; phospholipid composition with peptide NPh-Dox-NGR. Dox concentrations are 2μM.

The results showed that the death of tumor cells was observed mainly along the path of apoptosis. At the same time, for phospholipid compositions without doxorubicin (NPh) and without doxorubicin with an targeted peptide (NPh-NGR), insignificant cell death was noted (about 8%). When incubating cells with doxorubicin embedded in phospholipid nanoparticles with the targeted fragment NRG (NPh-Dox-NGR), cell death along the path of late apoptosis was observed to a greater extent, the percentage of cells was 2 times higher compared to the free form (55.4 and 27.8%, respectively).

Thus, the study of the pathway of cell death during incubation with a phospholipid composition of Dox, equipped with a targeted fragment of NRG, as well as with individual components of this composition showed that in all variants, cell death occurred mainly along the path of apoptosis.

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 075-15-2022-305).

References

1. *Nemtsova E.R. et al. Preclinical study of pharmacological properties of the drug "Doxorubicin-NF" // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2020. – Vol. 169. – No. 6. – P. 720-726.*
2. *Kostryukova L.V. et al. Targeted delivery system for doxorubicin based on a specific peptide and phospholipid nanoparticles // Biomed. Chem. – 2020. – Vol. 66. – No. 6. – P. 464-468*

УДК 616-006.66 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-73-75

МОДЕЛИРОВАНИЕ IN VITRO И IN SILICO МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРА РАКОВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК CD133

Лупатов А.Ю., Ким Я.С., Гисина А.М., Холоденко И.В., Курбатов Л.К., Копылов А.Т., Тихонова О.В., Згода В.Г., 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

С использованием клеточных моделей in vitro и in silico моделирования, основанного на данных транскриптомного и протеомного профилирования, были сформулированы гипотезы о молекулярной регуляции экспрессии маркера раковых стволовых клеток – проминина-1 (CD133). Роль потенциального ключевого регулятора в этом процессе была подтверждена с использованием CRISPR/Cas9 опосредованного геномного редактирования.

Ключевые слова: колоректальная аденокарцинома; раковые стволовые клетки; CD133; протеомный профиль; транскриптомный профиль; CRISPR/Cas9

Раковые стволовые клетки (РСК) представляют собой наиболее злокачественную субпопуляцию клеток в составе опухоли, сочетающие в себе свойства стволовых и опухолевых клеток. Именно РСК, обладая устойчивостью к химио- и радиотерапии, являются причиной метастазирования и рецидивов заболевания. Наиболее часто упоминаемым в контексте различных опухолевых заболеваний маркером РСК является гликопротеин CD133. Однако его функциональная роль и молекулярная регуляция экспрессии до сих пор не выяснены в полной мере.

Две клеточных линии опухолей кишечника (Caco2 и HT-29), а также линия гепатоклеточной карциномы HUH7 были использованы для выделения $CD133^{+/high}$ и $CD133^{-/low}$ субпопуляций при помощи цитометрической сортировки клеток. Выделенные клетки были подвергнуты сравнительному полнотранскриптомному анализу с использованием микрочипов Agilent и протеомному профилированию на основе тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения. В результате были идентифицированы шесть групп дифференциально экспрессируемых генов – по одной группе транскриптов и белков для каждой из трех клеточных линий. Несмотря на полное различие дифференциально экспрессирующихся транскриптов и белков между линиями, было сделано предположение о существовании общих молекулярных механизмов,

лежащих в основе регуляции CD133 в каждой из них. Полученную информацию загружали на онлайн платформу GeneXplain для поиска молекулярных ключевых регуляторов CD133. Подход основывался на использовании базы данных TRANSFAC для поиска кандидатных транскрипционных факторов, лежащих в основе работы анализируемой группы генов. База данных TRANSPATH использовалась для поиска потенциальных мастер-регуляторных молекул, контролирующих полученный на предыдущем этапе список транскрипционных факторов. Финальный список ключевых регуляторов CD133 получили в результате объединения итоговых списков транскрипционных факторов и мастер-регуляторных молекул с исключением тех молекул, которые присутствовали только в одном из списков. Финальный лист потенциальных ключевых регуляторов экспрессии CD133 включил в себя16 генов. Для выявления наиболее значимых объектов в полученных списках была использована система ранжирования, которая основывалась на частоте встречаемости объектов среди различных групп. Транскрипционный фактор TRIM28 получил самый высокий рейтинг среди потенциальных ключевых регуляторов CD133.

Для проверки гипотезы о вовлеченности TRIM28 в регуляцию экспрессии CD133, были получены 11 клонов CaCo2, в которых TRIM28 был нокаутирован с использованием CRISPR/Cas9. Во всех полученных клонах экспрессия CD133 отсутствовали или была существенно снижена, что свидетельствует о вовлеченности транскрипционного фактора TRIM28 в регуляцию экспрессии CD133.

Работа профинансирована Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках поддержки создания и развития научных центров мирового уровня, «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» (75-15-2022-305).

UDC 616-006.66 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-73-75

IN VITRO AND IN SILICO MODELING OF THE MOLECULAR REGULATION MECHANISM OF THE CANCER STEM CELL MARKER CD133 EXPRESSION

A.Yu. Lupatov, Y.S. Kim, A.M. Gisina, I.V. Kholodenko, L.K. Kurbatov, A.T. Kopylov, O.V. Tikhonova, V.G. Zgoda, K.N. Yarygin

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

Hypotheses on the molecular regulation of expression of the cancer stem cell marker prominin-1 (CD133) were proposed using cell models in vitro and in silico modeling based on data from transcriptomic and proteomic profiling. The role of the potential key regulator was confirmed using CRISPR/Cas9 mediated genome editing.

Key words: colorectal adenocarcinoma; cancer stem cells; CD133; proteomic profile; transcriptome profile; CRISPR/Cas9

Cancer stem cells (CSCs) are the most malignant subpopulation in a tumor, combining the properties of stem and tumor cells. It is CSCs, which are resistant to chemotherapy and radiotherapy, that are the cause of metastasis and recurrence of the disease. The CD133 glycoprotein is the most frequently mentioned in the context of various tumor diseases CSC marker. However, its functional role and molecular regulation have not yet been fully elucidated.

Two intestinal tumor cell lines (Caco2 and HT-29) as well as the HUH7 hepatocellular carcinoma were used to isolate $CD133^{+/high}$ and $CD133^{-/low}$ subpopulations by FACS. The isolated cells were subjected to comparative full transcriptome analysis using Agilent microarrays and proteomic profiling based on high resolution tandem mass spectrometry. As a result, six groups of differentially expressed genes were identified - one group of transcripts and one group of proteins for each of the three cell lines. Despite the complete dissimilarity of differentially expressed transcripts and proteins between the cell lines, it was suggested that there are common molecular mechanisms underlying the regulation of CD133 in each of them. The information obtained was uploaded to the GeneXplain online platform to search for molecular key regulators of CD133. The approach was based on the use of the TRANSFAC database to search for candidate transcription factors underlying expression of the analyzed group of genes. The TRANSPATH database was used to search for potential master regulatory molecules controlling the list of transcription factors obtained in the previous step. The final list of key CD133 regulators was obtained by combining the lists of transcription factors and master regulatory molecules with the exclusion of those molecules that were present in only one of the lists. The final list of potential key regulators of CD133 expression included 16 genes. To identify the most significant objects in the

lists, a ranking system was used, which was based on the frequency of occurrence of objects among different groups. The transcription factor TRIM28 received the highest rating among the possible key regulators of CD133.

To test the hypothesis of the involvement of TRIM28 in the regulation of CD133 expression, 11 TRIM28 knockout clones were obtained using CRISPR/Cas9 in CaCo2 cell line. In all the clones, CD133 expression was absent or was significantly reduced, which indicates the involvement of the TRIM28 transcription factor in the regulation of CD133 expression.

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 75-15-2022-305).

УДК 621.039.75 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-75-76

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ПРОФИЛЯ СПОРТСМЕНА ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ УПРАЖНЕНИЙ ВЫСОКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Мальсагова К.А., Степанов А.А., Копылов А.Т., Кайшева А.Л.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Россия, 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.
e-mail: kristina.malsagova86@gmail.com

В исследовании изучалось влияние высокоинтенсивных тренировок в экстремальных условиях (T=40°C) на метаболизм и иммунологические реакции организма спортсменов. Наблюдались значительные количественные изменения промежуточных продуктов трикарбоновых кислот и аминокислот после нагрузки.

Ключевые слова: метаболом; спортсмены; ИФА; масс-спектрометрический анализ.

Чрезмерная тренированность профессиональных спортсменов вызывает изменения в их метаболическом профиле крови, которые во многом зависят от типа и продолжительности режима тренировок [1].

Настоящее исследование направлено на выявление метаболических характеристик, ассоциированных с нагрузками на выносливость в экстремальных условиях. В работе показана актуальность проведения иммунологического тестирования на пищевые аллергены. Важность иммунологического тестирования обусловлена тем, что комбинация красителей, консервантов, отвердителей в составе используемых продуктов, включая биологически активные добавки, могут приводить к перегрузке иммунной системы и, как следствие, к развитию многочисленных хронических заболеваний.

В исследовании приняли участие 11 мужчин-спортсменов, занимающихся мультиспортивной гонкой на выносливость (триатлон). Основное нагрузочное тестирование (бег на дорожке «до отказа») проводилось при температуре 40°C и относительной влажности 60%.

По результатам масс-спектрометрического анализа плазмы крови спортсменов после физической нагрузки была выявлена повышенная концентрация восьми метаболитов: 2-кетоглутаровая кислота, аскорбиновая кислота, аспарагиновая кислота, цис-аконитовая кислота, лимонная кислота, серин, таурин, тирозин и двух гормонов: 11-дезоксикортизол, эстриол. Наблюдалось снижение концентрации 13 метаболитов: 3-метилгистидин, карнозин, цитруллин, креатинин, гистидин, гидроксипролин, лактат, лизин, орнитин, щавелевая кислота. пролин. янтарная кислота, тирозин, а также кортизола и дегидроэпиандростерона.

По результатам выявления IgG-опосредованных иммунологических реакций к 22 пищевым антигенам в образцах плазмы крови было установлено, что у всех участников исследования наблюдается реакция на компоненты пищевых продуктов. Однако проявление гиперактивной иммунологической реакции носит персонализированный характер.

Оценка метаболомных и иммунных показателей может дать ценные сведения о текущем физическом состоянии спортсменов и их адаптации к тренировкам, что может помочь в разработке будущих программ тренировок, предотвращении потенциальных расстройств, связанных с чрезмерными физическими нагрузками, а также улучшении общей работоспособности.

Работа выполнена в рамках проекта по созданию и развитию научных центров мирового уровня «Цифровой дизайн и персонализированное здравоохранение» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-305)

Литература

Lac G., Maso F. Biological Markers for the Follow-up of Athletes throughout the Training Season // Pathol. Biol. 2004. Vol. 52. P. 43–49.

UDC 621.039.75 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-75-76

MOLECULAR PROFILING OF ATHLETES PERFORMING HIGH-INTENSITY EXERCISES IN EXTREME ENVIRONMENTS

K.A. Malsagova, A.A. Stepanov, A.T. Kopylov, A.L. Kaysheva

The study studied the effect of high-intensity training under extreme conditions (T=40°C) on the metabolism and immunological reactions of the body of athletes. There were significant quantitative changes in the intermediate products of tricarboxylic acids and amino acids after exercise.

Keywords: metabolome; athletes; ELISA; mass spectrometric analysis.

Overtraining of professional athletes causes changes in their metabolic blood profile, which largely depend on the type and duration of the training regimen [1].

The present study is aimed at identifying the metabolic characteristics associated with endurance loads under extreme conditions. The paper shows the relevance of immunological testing for food allergens. The importance of immunological testing is due to the fact that the combination of dyes, preservatives, hardeners in the composition of the products used, including dietary supplements, can lead to an overload of the immune system and, as a result, to the development of numerous chronic diseases.

The study involved 11 male athletes involved in a multisport endurance race (triathlon). Basic stress testing (running on a track to failure) was carried out at a temperature of 40°C and 60% relative humidity.

According to the results of mass spectrometric analysis of the blood plasma of athletes after exercise, an increased concentration of eight metabolites was revealed: 2-ketoglutaric acid, ascorbic acid, aspartic acid, cis-aconitic acid, citric acid, serine, taurine, tyrosine and two hormones: 11-deoxycortisol, estriol. There was a decrease in the concentration of 13 metabolites: 3-methylhistidine, carnosine, citrulline, creatinine, histidine, hydroxyproline, lactate, lysine, ornithine, oxalic acid. proline. succinic acid, tyrosine, as well as cortisol and dehydroepiandrosterone.

Based on the results of the detection of IgG-mediated immunological reactions to 22 food antigens in blood plasma samples, it was found that all participants in the study had a reaction to food components. However, the manifestation of a hyperactive immunological reaction is personalized.

Assessment of metabolomic and immune parameters can provide valuable insights into athletes' current physical condition and adaptation to training, which can help design future training programs, prevent potential overexercise disorders, and improve overall performance.

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 75-15-2022-305).

References

Lac G., Maso F. Biological Markers for the Follow-up of Athletes throughout the Training Season // Pathol. Biol. 2004. Vol. 52. P. 43–49.

УДК 578.76; 571.27; 616-006.04 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-77-79

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ И ПОИСК АССОЦИИРОВАННЫХ С НИМИ ФАКТОРОВ РАЗВИТИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

О.А. Тарасова, С.М. Иванов, В.В. Поройков

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, с. 7, 119121
e-mail: olga.a.tarasova@gmail.com

С использованием методов биоинформатики выявлены механизмы изменения иммунного ответа при инфицировании девятью различными вирусами. Выявлены сигнальные пути, которые регулируют процессы в клетках, дифференциально-экспрессирующиеся гены, и мастер-регуляторы, общие для пациентов с исследуемыми вирусными инфекциями и онкологическими заболеваниями.

Ключевые слова: биоинформатика, вирусные инфекции, онкологические заболевания, иммунный ответ

Исследование молекулярных механизмов изменения функционирования иммунной системы при вирусных заболеваниях, которые могут быть ассоциированы с возникновением опухолей, является актуальным, поскольку, во-первых, для некоторых вирусных заболеваний показана их роль в патогенезе онкологического заболевания [1, 2], и, во-вторых, такие вирусные инфекции, как вызванные вирусом гепатита С, вирусами группы герпеса (в частности, вирус Эпштейна-Барр), Т-лимфотропным вирусом человека первого типа, могут протекать длительно без выраженных клинических проявлений, и оставаться не выявленными, или могут характеризоваться длительным латентным периодом.

В настоящей работе проведено изучение общих механизмов иммунного ответа при различных вирусных инфекциях. Выявлены общие гены, изменение транскрипции которых наблюдается при нескольких типичных вирусных инфекциях и, также, при опухолевых заболеваниях. Мы провели поиск сигнальных путей, в регуляцию которых могут быть вовлечены найденные гены и соответствующие белки. Был проведен поиск общих механизмов изменения иммунного ответа при инфицировании девятью различными вирусами, которые потенциально могут быть ассоциированы с онкологическими заболеваниями. Проведён анализ соответствующих профилей транскрипции мононуклеарных клеток периферической крови пациентов с инфекциями, в том числе вызванные цитомегаловирусом, вирусами Эпштейна-Барр, Т-клеточного лейкоза человека типа 1, гепатита В и С, вирусом иммунодефицита человека. Наборы данных, содержащие транскрипционные данные пациентов с вирусными инфекциями и здоровых людей, были получены из Gene Expression Omnibus (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/). Анализ данных проводился с помощью платформы Genome Enhancer (https://ge.genexplain.com/). В результате мы выявили общие для ответа на исследуемые вирусные инфекции сигнальные пути, регулирующие различные клеточные процессы. Мы обнаружили, что все девять вирусных инфекций вызывают активацию иммунитета, нарушение пролиферации клеток и повышение их восприимчивости к апоптозу. Применение методов анализа молекулярных сетей позволило выявить ряд мастер-регуляторов - белков, находящихся на вершине сигнальных путей, которые могут регулировать процессы транскрипции в клетках, и обуславливать поддержание текущего функционального состояния клеток. В числе мастер-регуляторов, обнаруженных нами с помощью реализованного подхода, - рецепторы инсулина, пролактина, ангиотензина II и иммуноглобулина ε. С применением анализа данных из текстов научных публикаций, мы оценили роль каждого из выявленных дифференциально-экспрессирующихся при вирусных инфекциях генов, и мастер-регуляторов в развитии онкологических заболеваний, для которых (а) предполагается взаимосвязь с вирусными инфекциями и (б) нет данных о такой взаимосвязи.

В результате проведенного анализа были найдены гены, транскрипция которых при вирусных инфекциях, и мастер-регуляторы, включая те, которые могут быть также вовлечены в патогенез некоторых опухолевых заболеваний. В частности, выявлены ассоциации между повышением уровня транскрипции молекулы CD38 при пяти вирусных инфекциях и при острых миелоидных лейкозах; снижением уровня MALT1 при вирусных инфекциях и отдельных видах лимфом, рака молочной железы. Для некоторых выявленных нами взаимосвязей данные литературы позволяют подтвердить роль гена в развитии опухолевого заболевания, некоторые из взаимосвязей являются новыми.

Дополнительно, поиск по данным литературы позволил выявить основные сигнальные пути, которые,

по-видимому, вовлечены в изменение функционирования иммунной системы как при вирусных инфекциях, так и при опухолевых заболевания, включая пути Hedgehog, Nf-kb-регулируемые пути.

Выявленные с применением методов биоинформатики молекулярные механизмы регуляции функционирования иммунной системы при вирусных инфекциях, которые могут быть ассоциированы с развитием онкологических заболеваний, являются основой для поиска новых терапевтических стратегий ранней терапии и профилактики онкологических заболеваний.

Литература

1. *Yarchoan R., Uldrick T.S. HIV-Associated Cancers and Related Diseases // N Engl J Med. – 2018. V. 11., №. 378, C. 1029-1041.*
2. *Wołącewicz M., Becht R., Grywalska E., Niedźwiedzka-Rystwej P. Herpesviruses in Head and Neck Cancers // Viruses. – 2020. V. 2, № 12, C. 172.*

UDC 578.76; 571.27; 616-006.04 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-77-79

AN ANALYSIS OF IMMUNE RESPONSE REGULATION IN VIRAL INFECTIONS AND SEARCH FOR FACTORS OF CANCER DEVELOPMENT

O.A. Tarasova, S.M. Ivanov, V.V. Poroikov

*Institute of Biomedical Chemistry,
119121, 10-7, Moscow, Pogodinskaya st.*

We revealed the mechanisms of changes in immune response during infections caused by nine different viruses that may be associated with the development of cancer. We found signaling pathways that regulate various cellular processes common to patients with the studied viral infections, differentially expressed genes, and master regulators. We searched for differentially expressed genes that can also be associated with the development of cancer.

Keywords: bioinformatics, viral infections, cancer, immune response

The study of molecular mechanisms of the immune system regulation in viral diseases that may be associated with the development of cancer is of high importance. First, for some viral diseases their role in the pathogenesis of cancer has been shown [1, 2]. Second, such viral infections as those caused by hepatitis C virus, herpesviruses (in particular, Epstein-Barr virus), human T-lymphotropic virus type 1 can persist for a long time without any clinical manifestations, and remain undetected, or can be characterized by latency.

In the present work we studied the general mechanisms of the immune response in various viral infections. We identified common genes whose transcriptional changes are observed in several typical viral infections and also in cancer. We searched for signaling pathways that are regulated by found genes and proteins encoded by them. We searched for common mechanisms of immune response regulation during infections caused by nine different viruses and identify which of them could be associated with cancer. Relevant transcription profiles of peripheral blood mononuclear cells of patients with infections, including those caused by cytomegalovirus, Epstein-Barr viruses, human T-cell leukemia type 1, hepatitis B and C, and human immunodeficiency virus were analyzed. Data sets containing transcriptional data from patients with viral infections and healthy people were obtained from Gene Expression Omnibus (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/). Data analysis was performed using the Genome Enhancer platform (https://ge.genexplain.com/). As a result, we identified signaling pathways common to the response to the studied viral infections that may regulate various cellular processes. We found that all nine viral infections cause immune activation, impaired cell proliferation and increased rate of apoptosis. The application of network-based analysis allowed us to identify master regulators - proteins located at the top of signaling pathways that can regulate transcription processes to maintain current functional state of cells. In particular, using our approach, we detected insulin, prolactin, angiotensin II and immunoglobulin ε receptors as master regulators. Using data analysis from the texts of scientific publications, we evaluated the role of each differentially expressed gene and master regulators in viral infections and development of cancers for which (a) a relationship with viral infections was assumed earlier and (b) no data on such a relationship.

The analysis allowed us revealing genes with altered transcription in viral infections and master regulators, including those that may also be involved in the development of some tumor diseases. In particular, we found the associations between increased levels of CD38 molecule transcription in five viral infections and in acute myeloid

leukemia; decreased levels of MALT1 in viral infections and certain types of lymphoma and breast cancer. For some of the relationships we identified, the literature data allow us to confirm the role of the gene in the development of tumor disease; some of the relationships are novel.

Additionally, a literature search allowed us to identify key signaling pathways that appear to be involved in altering immune system function in both viral infections and cancer, including Hedgehog, Nf-kb-regulated pathways.

The molecular mechanisms immune response regulation in viral infections that may be also associated with the development of cancer can be considered to be the basis for the search for new therapeutic strategies for the treatment or prevention of cancer.

References:

1. *Yarchoan R., Uldrick T.S. HIV-Associated Cancers and Related Diseases // N Engl J Med. – 2018. V. 11., №. 378, C. 1029-1041.*
2. *Wołącewicz M., Becht R., Grywalska E., Niedźwiedzka-Rystwej P. Herpesviruses in Head and Neck Cancers // Viruses. – 2020. V. 2, № 12, C. 172.*

УДК 576.38; 577.29 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-79-81

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ АКТИВАЦИИ TLR3 В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА НА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА

Толстова Т.В., Кожин П.М., Доценко Е.Д., Ромашин Д.Д., Русанов А.Л., Лузгина Н.Г.

*Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича,
Россия, 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8
e-mail: tolstova@ibmc.msk.ru*

Примирование TLR3 Poly(I:C) в МСК дозозависимо стимулирует экспрессию (*IDO, TSG-6, COX-2*) и секрецию (IL-10, PGE2) иммуномодулирующих факторов. Такие изменения приводят к формированию иммуносупрессивного фенотипа, что выражается в снижении количества пролиферирующих и увеличении числа апоптотических клеток линии Jurkat при совместном культивировании.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки человека, МСК, TLR3, иммуносупрессия, Jurkat, Poly(I:C)

Иммуномодулирующие свойства мезенхимальных стромальных клеток человека (МСК) определяют перспективность их применения в клеточной терапии, например, для лечения реакции «трансплантат против хозяина», аутоиммунных заболеваний и др. Прекондиционирование МСК с полиинозиновой: полицитидиловой кислотой (Poly(I:C)) является одной из стратегий повышения их клинической эффективности за счет придания клеткам целевого функционального статуса. В частности, такая активация TLR3 позволяет усиливать иммуносупрессивную активность МСК. При этом, варьирование концентрации лиганда и времени его воздействия, определяет эффективность МСК подавлять пролиферацию иммунных клеток, а также уровень секреции противовоспалительных факторов. Цель настоящего исследования - выбор оптимального протокола примирования TLR3 МСК жировой ткани человека с целью усиления их иммуносупрессивных свойств.

Показано, что прекондиционирование МСК с 1 и 10 мкг/мл Poly(I:C) в течении 1 или 3 часов приводит к дозозависимому увеличению продукции иммуносупрессивных факторов. В частности, максимальное увеличение экспрессии индоламин-2,3-диоксигеназы (*IDO*, в 390,2 раз), стимулируемого фактором некроза опухоли гена – 6 (*TSG-6*, в 19,2 раза), циклооксигеназы-2 (*COX-2*, в 4,2 раза), а также секреции IL-10 и PGE2 до 86,9 и 1647,7 пг/мл, соответственно, отмечали при активации TLR3 в течение 3 часов 10 мкг/мл лиганда. Такой протокол примирования МСК также приводил к усиленному снижению количества пролиферирующих и увеличению количества апоптотических клеток Jurkat, активированных фитогемагглютинином, при их совместном культивировании (относительно интактных МСК). Кроме того, в результате протеомного анализа МСК и активированных МСК (МСК+) было выявлено 1686 белков. В МСК+ дифференцировали 53 белка с изменившейся экспрессией. Используя термины Gene Ontology и Reactome Pathway для фильтрации набора данных, получено, что белки, индуцированные Poly(I:C), в первую очередь связаны с активацией иммунного и противовирусного ответов. Белки с наиболее выраженной активацией (топ 10) представляли собой

антивирусные белки (STAT1, STAT2, DDX58, GBP1 и др.), а также связанные с сигналиногом IFN I типа (IFIT1, IFIT3, HLA-A, HLA-B, ISG15 и др.). Анализ в String всех изменившихся в МСК+ белков показал, что между ними существует релевантное белковое взаимодействие и компоненты комплекса связаны с сигналингом IFN I типа и негативной регуляцией DDX58/IFIH1 пути. При этом, в МСК+ отмечали повышенную экспрессию белков клеточной адгезии (ICAM-I и GAL3), которые усиливают клеточный контакт МСК с иммунными клетками, и могут опосредовать их иммуносупрессию. Увеличение экспрессии белков PARP14, Hs-PSMB8, USP18 и GBP4 в МСК+ также может быть связано с наблюдаемыми иммуносупрессивными свойствами. Отметим, что активация TLR3 приводит к усилению экспрессии маркёров адипогенной (*ADIPOQ, PPARγ*) и сохранению экспрессии маркёров остеогенной (*ALPL, RUNX2*) дифференцировки, что согласуется с результатами протеомного исследования.

Таким образом, полученный в данной работе протокол прекондиционирования МСК в течение 3 часов с 10 мкг/мл Poly(I:C) приводит к активации TLR3 ассоциированных сигнальных путей. Это, обуславливает усиление иммуносупрессивного эффекта МСК в отношении активированных модельных Т-клеток, за счет секреции противовоспалительных молекул (IL-10, PGE2), увеличения экспрессии генов *TSG-6*, *COX-2* и белков IDO, ICAM-I, PARP14, Hs-PSMB8, USP18 и GBP4. Кроме того, показано, что активация TLR3 усиливает адипогенез при дифференцировке МСК.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800481-0).

UDC 576.38; 577.29 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-79-81

EFFECT OF TLR3 ACTIVATION CONDITIONS IN HUMAN MESENCHIMAL STROMAL CELLS ON IMMUNOMODULATORY PROPERTIES

T.V. Tolstova, P.M. Kozhin, E.D. Dotsenko, D.D. Romashin, A.L. Rusanov, N.G. Luzgina

Institute of Biomedical Chemistry, 119121, 10, Pogodinskaya street, Moscow, Russia
e-mail: tolstova@ibmc.msk.ru

TLR3 Poly(I:C) priming in MSCs doze-dependently stimulates expression (*IDO, TSG-6, COX-2*) and secretion (IL-10, PGE2) of immunomodulatory factors. These changes lead to the formation of immunosuppressive phenotype, showing a decrease in a number of proliferating cells and an increase of apoptotic cells Jurkat while co-cultivation.
Key words: human mesenchymal stromal cells, MSCs, TLR3, immunosuppression, Jurkat, Poly(I:C)

Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal human cells (MSCs) define the prospects of their application in a cell therapy, e.g. for the treatment of graft versus host syndrome, autoimmune diseases etc. Preconditioning of MSCs with polyinosinic: polycytidylic acid (Poly(I:C)) is one of the strategies used for the increase of the clinical efficiency by giving the cells the target functional status. Such activation of TLR3 allows to enhance the immunosuppressive activity of MSCs. At the same time varying of ligand concentration and exposure time determine the efficiency of MSCs to suppress the proliferation of immune cells, as well as the secretion level of anti-inflammatory factors. The aim of this study is to find the optimal TLR3 priming protocol of human adipose-derived MSCs in order to enhance the immunomodulatory properties.

Our results have shown the MSCs preconditioning with 1 and 10 μg/mL Poly(I:C) for 1 or 3 hours leads to dose-depending increase of immunomodulatory factors production. In particular the maximum increase of indolamine-2,3-dioxygenase expression (*IDO*, in 390,2 times), TNF alpha induced protein 6 (*TSG-6*, in 19,2 times) cyclooxygenase-2 (*COX-2*, in 4,2 times), and also secretion of IL-10 and PGE2 up to 86,9 and 1647,7 pg/mL respectively when TLR3 was activated for 3 hours with 10 μg/mL of ligand. This protocol of MSCs priming also resulted in enhanced decrease on a number of proliferating cells and increase in apoptotic Jurkat cells, activated by phytohemagglutinin during co-cultivation (relative to intact MSCs). In addition, as a result of proteomic analysis of MSCs and activated MSCs (MSCs+) we found 1686 proteins, and 53 of them were with a changes expression in MSCs+. Using the terms Gene Ontology and Reactome Pathway for the dataset filtration, it was found that proteins induced with Poly(I:C) are primarily associated with an activation of immune and antiviral response. Thus, proteins with a most pronounced activation (top 10) included antiviral proteins (STAT1, STAT2, DDX58, GBP1 etc.), and also the ones associated with signaling IFN I type (IFIT1, IFIT3, HLA-A, HLA-B, ISG15 etc.). Analysis in String of all of the proteins modified in MSCs+ showed that there is relevant protein interaction between them, and the complex components are connected to IFN I type signaling and negative regulation of DDX58/IFIH1 pathway. However, in MSCs+ an increased expression of the proteins of cell adhesion (ICAM-I, GAL3) was noted. They establish the cell contact

between MSCs and immune cells, and might mediate their immunosuppression. Increased expression of PARP14, Hs-PSMB8, USP18 и GBP4 proteins in MSC+ might also be related to the observed immunosuppressive properties. It should be noted that TLR activation leads to an increase in the expression of adipogenic differentiation markers (*ADIPOQ, PPARγ*) and preservation of the expression of the osteogenic differentiation markers (*ALPL, RUNX2*), what is in correlation with the proteomic analysis results.

Thus, the resulted protocol of MSC preconditioning during 3 hours with 10 μg/mL Poly(I:C) developed in this study leads to the activation of TLR3-associated signal pathways. It causes an increase if immunosuppressive effect of MSCs towards the activated model T-cells due to the secretion of anti-inflammatory molecules (IL-10, PGE2) and increase in expression of *TSG-6*, *COX-2* and proteins IDO, ICAM-I, PARP14, Hs-PSMD8, USP18 and GBP4. In addition, our study showed that TLR3 activation induces adipogenesis during MSC differentiation.

The study was carried out as part of the Program for fundamental research in the Russian Federation for the long-term period (2021–2030) (№ 122022800481-0).

УДК 577.29 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-81-82

ПЕРСПЕКТИВЫ МЕТАБОЛОМНОЙ ДИАГНОСТИКИ: МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ МЕТАБОГРАММА КРОВИ

Трифонова О.П., Балашова Е.Е., Маслов Д.Л., Лохов П.Г., Арчаков А.И.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Россия
119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8
e-mail: oxana.trifonova@gmail.com

Разработана масс-спектрометрическая метабограмма крови как упрощенный и клинически применимый способ измерения метаболома плазмы крови. Семь компонентов метабограммы, охватывающие ~70% вариабельности метаболома плазмы крови, являются функционально связанными группами метаболитов, ассоциированными с основными биохимическими процессами в организме.

Ключевые слова: метаболомная диагностика; метаболом крови; масс-спектрометрия; метабограмма.

В метаболомике множество метаболитов измеряется одновременно за один анализ, что открывает большие перспективы для клинической лабораторной диагностики. В этой работе масс-спектрометрическая метабограмма была разработана как упрощенный и клинически применимый способ измерения метаболома плазмы крови. Для составления метабограммы были использованы образцы плазмы крови здоровых добровольцев мужского пола примерно одного возраста (n = 48), масс-спектрометрический анализ с прямым вводом (Direct Injection Mass Spectrometry, DIMS) низкомолекулярной фракции образцов и анализ главных компонентов (Principal Component Analysis, PCA) полученных масс-спектрометрических данных. Семь компонентов метабограммы, определенных PCA, которые охватывают ~70% вариабельности метаболома плазмы крови, были охарактеризованы с использованием анализа обогащения набора метаболитов (Metabolite Set Enrichment Analysis, MSEA) и результатов клинических тестов участвующих добровольцев. Было установлено, что компоненты метабограммы являются функционально связанными группами метаболома крови, ассоциированными с регуляцией, липидно–углеводными и липидно–аминными компонентами крови, эйкозаноидами, поступлением липидов в организм и функцией печени, тем самым предоставляя много клинически значимой информации. Таким образом, метабограмма предоставляет возможность применять результаты метаболомики в клинике. Особенности метабограммы также обсуждаются в сравнении с тонкослойной хроматографией и анализом метаболома крови методом жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией.

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

UDC 577.29 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-81-82

FUTURE PERSPECTIVES OF METABOLOMICS DIAGNOSTICS: MASS SPECTOMETRIC BLOOD METABOGRAM

O.P. Trifonova, E.E. Balashova, D.L. Maslov, P.G. Lokhov, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia
10 Building 8, Pogodinskaya Street, 119121 Moscow
e-mail: oxana.trifonova@gmail.com

A mass spectrometric blood metabogram has been developed as a simplified and clinically applicable method for measuring the blood plasma metabolome. The seven components of the metabogram, which cover ~70% of blood plasma metabolome variability, are functionally related groups of metabolites associated with the main biochemical processes in the body.

Keywords: metabolomics diagnostics; blood metabolome; mass spectrometry; metabogram.

In metabolomics, many metabolites are measured simultaneously in a single run and that opens up wide prospects for clinical laboratory diagnostics. In this work, a mass spectrometric metabogram was developed as a simplified and clinically applicable way of measuring the blood plasma metabolome. To develop the metabogram, blood plasma samples from healthy male volunteers (n = 48) of approximately the same age, direct infusion mass spectrometry (DIMS) of the low molecular fraction of samples, and principal component analysis (PCA) of the obtained mass spectrometry data were used. The seven components of the metabogram defined by PCA, which cover ~70% of blood plasma metabolome variability, were characterized using a metabolite set enrichment analysis (MSEA) and clinical test results of the participating volunteers. It has been established that the components of the metabogram are functionally related groups of the blood metabolome associated with regulation, lipid–carbohydrate, and lipid–amine blood components, eicosanoids, lipid intake into the organism, and liver function thereby providing a lot of clinically relevant information. Therefore, metabogram provides the possibility to apply the metabolomics performance in the clinic. The features of the metabogram are also discussed in comparison with the thin-layer chromatography and with the analysis of blood metabolome by liquid chromatography combined with mass spectrometry.

The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021-2030) (№122030100168-2).

УДК 577.15.08 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-82-84

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ БИОСЕНСОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Филиппова Т.А., Масамрех Р.А., Шумянцева В.В., Фарафонова Т.Е., Мошковский С.А., Кузиков А.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»,
119121, Россия, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8
e-mail: lipivif@gmail.com

Разработана электрохимическая система для определения протеазной активности ферментов, основанная на электрохимическом окислении остатков тирозина модельных пептидов. С помощью разработанной системы были определены параметры стационарной кинетики и специфичность трипсина по отношению к пептидам с различной последовательностью аминокислот.

Ключевые слова: трипсин, печатные графитовые электроды, электроокисление тирозина, электрохимический биосенсор, наночастицы золота.

Протеолитические ферменты (протеазы) являются ферментами класса гидролаз, осуществляющими гидролиз пептидных связей в белках. Разработка новых высокоэффективных подходов к определению активности данных ферментов актуальна в связи с широким применением протеаз в различных

биотехнологических отраслях, а также в изучении патологических процессов. Среди существующих на сегодняшний день подходов к определению протеазной активности ферментов, электрохимические методы имеют ряд преимуществ, таких как высокая чувствительность, возможность миниатюризации аналитического процесса и удобство практического использования. Известно, что ряд аминокислот подвергается необратимому электрохимическому окислению и этот процесс может быть зарегистрирован с помощью электрохимических методов. Мы предположили, что включение электроокисляемых аминокислотных остатков в качестве редокс-метки в последовательность аминокислот модельного пептида может быть использовано для определения протеазной активности ферментов. Существенным преимуществом предложенного нами подхода является отсутствие необходимости включения дополнительной редокс-метки в процессе синтеза модельных пептидов.

На основании предложенного подхода нами была разработана система для определения активности трипсина, модифицированного восстановительным метилированием остатков лизина [1]. Предложенная система была основана на электрохимическом окислении остатков тирозина пептидов, имеющих специфические сайты расщепления трипсином. Пептиды, полученные методом твердофазного синтеза, были иммобилизованы на поверхности модифицированных наночастицами золота печатных графитовых электродов. После инкубации модифицированных наночастицами золота печатных графитовых электродов с иммобилизованным пептидом (CGGGRYR) с различными концентрациями трипсина наблюдалось время-зависимое снижение сигнала окислительного пика тирозина вследствие сайт-специфического расщепления трипсином иммобилизованного пептида с образованием связанного с электродом пентапептида (CGGGR) и свободного дипептида (YR). На основании полученных данных нами были рассчитаны параметры стационарной кинетики расщепления пептида трипсином. Разработанная электрохимическая система была использована для сравнительного анализа кинетических параметров и специфичности трипсина по отношению к модельным пептидам с различной последовательностью аминокислот. Мы показали, что разработанная система применима для оценки специфичности протеаз. Предложенный нами подход к определению протеазной активности может быть использован для изучения свойств других протеаз, имеющих биотехнологическое и медицинское значение.

Работа выполнена в рамках проекта по созданию и развитию научных центров мирового уровня «Цифровой дизайн и персонализированное здравоохранение» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение No 075-15-2022-305).

Литература

1. *Filippova T.A., Masamrekh R.A., Shumyantseva V.V., Latsis I.A., Farafonova T.E., Ilina I.Y., Kanashenko S.L., Moshkovskii S.A., Kuzikov A.V. Electrochemical biosensor for trypsin activity assay based on cleavage of immobilized tyrosine-containing peptide // Talanta. 2023. Vol. 257. P. 124341.*

UDC 577.15.08 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-82-84

ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR DETERMINING THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF ENZYMES

T.A. Filippova, R.A. Masamrekh, V.V. Shumyantseva, T.E. Farafonova, S.A. Moshkovskii, A.V. Kuzikov

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121, Russia, Moscow, Pogodinskaya str, 10, building 8 e-mail: e-mail: lipivif@gmail.com

The electrochemical system for determining the proteolytic activity of enzymes based on the electrochemical oxidation of tyrosine residues of model peptides has been developed. Using the developed system, the parameters of steady-state kinetics and specificity of trypsin toward peptides with different amino acid sequences were determined.

Key words: trypsin, screen-printed electrodes, tyrosine electrooxidation, electrochemical biosensor, gold nanoparticles.

Proteolytic enzymes (proteases) are hydrolase enzymes that cleave peptide bonds of proteins. The development of new highly efficient approaches for determining the activity of these enzymes is relevant, since they are widely used in a number of areas of biotechnology and in the study of pathological processes. Among the current approaches for determining the proteolytic activity of enzymes, electrochemical methods have a number

of advantages, such as high sensitivity, the possibility of miniaturization of the analytical process, and ease of practical application. It is known that a number of amino acids undergo irreversible electrochemical oxidation, and this process can be detected by electrochemical methods. We suggested that the inclusion of electrooxidative amino acid residues as a redox label in the amino acid sequence of a model peptide can be used to determine the protease activity of enzymes. A significant advantage of our proposed approach is the absence of the need to include an additional redox label during the synthesis of model peptides. Based on the proposed approach, we have developed a system for determining the activity of trypsin modified by reductive methylation of lysine residues [1]. The proposed system is based on the electrochemical oxidation of tyrosine residues of peptides with specific trypsin cleavage sites. Model peptides obtained by solid-phase synthesis were immobilized on the surface of screen-printed graphite electrodes modified with gold nanoparticles. After incubation of nanoparticle-modified screen-printed graphite electrodes with immobilized peptide (CGGGRYR) with various concentrations of trypsin, a time-dependent decrease in the signal of the oxidative peak of tyrosine was observed due to site-specific cleavage of the immobilized peptide by trypsin with the formation of electrode-bound pentapeptide (CGGGR) and a free dipeptide (YR). Based on the data obtained, the parameters of the steady-state kinetics of cleavage of the model peptide by trypsin were calculated. The developed electrochemical system was used for a comparative analysis of the kinetic parameters and specificity of trypsin toward model peptides with different amino acid sequences. We have shown that the system we have developed is applicable for assessing the specificity of proteases. Proposed by us approach for determining the activity of proteases can be used to study the properties of other proteases of biotechnological and medical importance.

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 075-15-2022-305).

References

1. *Filippova T.A., Masamrekh R.A., Shumyantseva V.V., Latsis I.A., Farafonova T.E., Ilina I.Y., Kanashenko S.L., Moshkovskii S.A., Kuzikov A.V. Electrochemical biosensor for trypsin activity assay based on cleavage of immobilized tyrosine-containing peptide // Talanta. 2023. Vol. 257. P. 124341.*

УДК 616 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-84-86

"МЕТАБОСКАН" – СИСТЕМА ДИАГНОСТИКИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ МЕТАБОЛОМНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ

Шестакова К.М., Москалева Н.Е., Апполонова С.А.

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия
119435, Москва, Большая Пироговская ул., 2, стр. 4
E-mail: shestakova_k_m@staff.sechenov.ru

Разработанное нами программное обеспечение «Метабоскан» направлено на проведение скрининговой диагностики сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний посредством биоинформационной обработки результатов целевого метаболомного профилирования плазмы крови пациента в рамках одного анализа. Такая система позволит проводить своевременное выявление рассматриваемых патологий, что будет способствовать повышению качества проводимой диагностики, а также снижению материальных затрат на здравоохранение.

Ключевые слова: диагностика, сердечно-сосудистые заболевания, онкологические заболевания, метаболомика, биоинформатика

На сегодняшний день, активное развитие методов метаболомного профилирования постепенно приводит к возможности их внедрения в клиническую практику, как в диагностических, так и прогностических целях. Разработанный в нашей лаборатории прототип системы «Метабоскан» направлен на проведение скрининговой диагностики сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний посредством биоинформационной обработки результатов целевого метаболомного профилирования плазмы крови пациента в рамках единого лабораторного анализа.

Предлагаемый метаболомный скрининг включает в себя анализ более 100 метаболитов и их соотношений, в числе которых продукты энергетического обмена, биосинтеза аминокислот, катаболизма триптофана, а также ацилкарнитины, нуклеозиды и водорастворимые витамины. Для их количественного определения нами была разработана и валидирована единая экспресс методика методом высокоэффективной жидкостной хроматографии тандемной масс-спектрометрии (время анализа - 5 минут). Помимо этого, используемый в качестве пробоподготовки метод преципитации белка также позволяет значительно сократить общее время анализа и минимизировать риск ошибки при подготовке образцов.

Расчет вероятности развития исследуемых патологий, заложенный в работу системы «Метабоскан», заключается в применении современных классификационных моделей машинного обучения с учителем, которые предварительно обучаются и валидируются на экспериментально полученных данных метаболомного профилирования пациентов с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями. С использованием метрик качества для тестовых наборов данных по каждому из рассматриваемых заболеваний проводят выбор наиболее оптимального алгоритма классификации. Реализация системы в виде компьютерного приложения выполнена с использованием аналитического программного фреймворка Plotly Dash. В первую очередь система устанавливает вероятность наличия или отсутствия нарушения в целом по конкретной нозологии и уже далее, при его наличии, выполняет дифференциацию внутри патологии. Кроме того, проводится оценка вероятности наличия и более «узких» заболеваний, как например, диагностики сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса, осложняющей течение артериальной гипертензии. На сегодняшний день данное приложение функционирует в рамках модуля «Кардио», направленного на оценку наличия сердечно-сосудистых патологий – гипертонической болезни, ишемической болезни сердца и хронической сердечной недостаточности. Однако уже в скором времени будет доступен модуль «Онко», оценивающий вероятность наличия у пациента рака легкого, рака предстательной железы, рака почки и колоректального рака.

Относительная универсальность методов целевого метаболомного профилирования, а также использование в процессе анализа трехквадрупольных хромато-масс-спектрометров, рутинно применяющихся для неонатального скрининга и терапевтического мониторинга в крупных лабораторных центрах, дает возможность трансфера и масштабирования предлагаемой технологии. Помимо этого, на текущий момент нами проводится валидация методики анализа данных метаболомных панелей с использованием в качестве биологических образцов сухих пятен крови (МетабоСкан-карта»), что даст возможность значительно облегчить отбор, транспортировку и хранение биологического материала.

Таким образом, развитие и внедрение диагностической системы «МетабоСкан» позволит проводить своевременное выявление сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний человека, что будет способствовать повышению качества диагностики, а также снижению материальных затрат на здравоохранение. В будущем планируется расширение диагностической системы на все ключевые социально-значимые патологии и введение модуля эффективности терапевтического лечения.

Работа выполнена в рамках проекта по созданию и развитию научных центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение No 075-15-2022-305).

UDC 616 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-84-86

"METABOSCAN" – A DIAGNOSTIC SYSTEM FOR CARDIOVASCULAR AND ONCOLOGICAL DISEASES BASED ON METABOLOMIC PROFILING

K.M. Shestakova, N.E. Moskaleva, S.A. Appolonova

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University) Moscow, Russia
119435, Moscow, Bolshaya Pirogovskaya, 2, str. 4
E-mail: shestakova_k_m@staff.sechenov.ru

Today, the active development of metabolomic profiling methods gradually leads to the possibility of their introduction into clinical practice, both for diagnostic and prognostic purposes. The prototype of the Metaboscan system developed in our laboratory is aimed at screening diagnostics of cardiovascular and oncological diseases through bioinformatic processing of the results of targeted metabolomic profiling of the patient's blood plasma as part of a single laboratory analysis.

The proposed metabolomic screening approach includes the analysis of more than 100 metabolites and their ratios, including products of energy metabolism, amino acid biosynthesis, tryptophan catabolism, as well as acylcarnitines, nucleosides, and water-soluble vitamins. For their quantitative determination, we developed and validated a single express method using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (analysis time - 5 minutes). In addition, the protein precipitation method used for sample preparation also significantly reduced the total analysis time and minimized the risk of sample preparation errors.

The probability calculation of the development of the studied pathologies, incorporated into the Metaboscan system, utilizes modern supervised machine learning classification models, which were preliminarily trained and validated on experimentally obtained metabolomic data of patients with cardiovascular and oncological diseases. The most optimal classification algorithm was selected using quality metrics applied for each of the considered diseases. The system was implemented as a computer application using the analytical software framework Plotly Dash. First of all, the system establishes the probability of the presence or absence of a disease, in general, for a specific nosology, and then performs differentiation within the pathology. In addition, the probability of the presence of more “narrow” diseases, such as the diagnosis of heart failure with a preserved ejection fraction, which complicates the course of arterial hypertension, is also being assessed. Today, this application functions as part of the ‘Cardio’ module, aimed at assessing the presence of cardiovascular pathologies - hypertension, coronary heart disease and chronic heart failure. However, the ‘Onco’ module will soon be available, which assesses the likelihood of a patient having lung cancer, prostate cancer, kidney cancer, and colorectal cancer.

The relative versatility of targeted metabolomic profiling methods, as well as the use of triple-quadrupole chromato-mass spectrometers in the analytical process, makes it possible to transfer and scale the proposed technology. In addition, we are currently validating the methodology for analyzing data from metabolomic panels using dry blood spots as biological samples (MetaboScan-card), which will make it possible to significantly facilitate the selection, transportation and storage of biological material.

Thus, the development and implementation of the MetaboScan diagnostic system will allow timely detection of human cardiovascular and oncological diseases, which will improve the quality of diagnostics, as well as reduce material costs for healthcare. In the future, it is planned to expand the diagnostic system to all key socially significant pathologies and introduce a module for the effectiveness of therapeutic treatment.

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 075-15-2022-305).

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

РАЗРАБОТКА ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ИММУННОГО ОТВЕТА НА КАНДИДАТНУЮ ВАКЦИНУ
Тимофеева А.М., Литвинова Е.А., Долгушин С.А., Седых С.Е., Невинский Г.А. 89

DEVELOPMENT OF A PLATFORM FOR ASSESSING THE EFFICIENCY
OF THE IMMUNE RESPONSE TO A CANDIDATE VACCINE
A.M. Timofeeva, E.A. Litvinova, S.A. Dolgushin, S.E. Sedykh, G.A. Nevinsky 90

УДК 571.27; 615.37 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-89-90

РАЗРАБОТКА ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА КАНДИДАТНУЮ ВАКЦИНУ

Тимофеева А.М., Литвинова Е.А., Долгушин С.А., Седых С.Е., Невинский Г.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090, ул. Лаврентьева 8.
e-mail: anna.m.timofeeva@gmail.com

Разработана платформа для определения в плазме крови антител, специфичных к иммуногенным эпитопам целевого белка. Данная платформа является удобным инструментом скрининга кандидатных вакцин, и выбора таких из них, которые стимулируют выработку антител, соответствующих природному инфекционному агенту.

Ключевые слова: платформа для скрининга, скрининг антител, вакцина, антитела, SARS-CoV-2, S-белок, COVID-19, инфекционные заболевания, разработка вакцин.

При разработке вакцины кроме выбора эффективного иммуногена важна скорость, поэтому платформа, которая может ускорить разработку вакцины, имеет важное значение. Гуморальный иммунитет против вирусной инфекции зависит от способности В-клеток генерировать репертуар антител, нейтрализующих вирус, однако далеко не каждый фрагмент вирусного белка приводит к наработке таких антител. Разрабатываемая вакцина должна стимулировать наработку паттерна антител, распознающих иммуногенные эпитопы целевого белка, сходного с таковым у переболевших. Существенной проблемой разработки новых вакцин является отсутствие технологий анализа того, насколько спектр антител, образующихся у вакцинированных пациентов соответствует антителам у переболевших пациентов. **Целью** данной работы является разработка платформы для скрининга антител, образующихся на различные эпитопы целевого белка в результате иммунизации различными вакцинами. В результате разработана система скрининга антител, узнающих основной набор эпитопов для сравнения репертуара антител при инфекции SARS-CoV-2 и иммунизации различными вакцинами. В основе разработанной платформы для скрининга лежит метод иммуноферментного анализа с использованием олигопептидов, сорбированных в лунках планшета. Положительный сигнал ИФА свидетельствует о доступности для иммунной системы этого участка поверхности целевого белка. Эффективность разработанной платформы оценена для плазмы крови иммунизированных мышей (RBD, вакцинами Спутник V и КовиВак), а также пациентов, переболевших COVID-19 и вакцинированных (препаратами Спутник V и КовиВак). При разработке платформы использовано 19 олигопептидов, соответствующих антигенным детерминантам S-белка SARS-CoV-2.

У мышей, иммунизированных RBD, показано образование антител, узнающих аминокислотные последовательности, соотвествующие олигопептиду, расположенному на поверхности RBD. У мышей, иммунизированных вакцинами Спутник V и КовиВак, выявлены сходные паттерны узнаваемых олигопептидных последовательностей. В плазме крови доноров, переболевших COVID-19, выявлены антитела, узнающие все использованные олигопептиды. Согласно модели, построенной в AlphaFold2, данные участки действительно расположены на поверхности S-белка. При иммунизации вакцинами профиль образующихся антител имеет сходные черты с профилем антител, образующихся в результате перенесенного COVID-19.

Таким образом, разработаная платформа позволяет определять наличие в плазме крови антител, специфичных к иммуногенным эпитопам целевого белка и проводить сравнение с антителами, образующимися при вакцинации. Сопоставление пула антител, образующихся в организме после перенесенного инфекционного заболевания и в результате вакцинации является удобным инструментом для скрининга потенциала вакцин, и выбора таких из них, которые стимулируют выработку антител, соответствующих природному инфекционного агенту. Таким образом, разработка скрининговой платформы, направленной на выявление потенциала кандидатной вакцины, будет способствовать ускорению срока разработки новых вакцин, в том числе, в условиях пандемии.

Исследование поддержано Российским научным фондом (проект № 21-75-10105 рук. Тимофеева А.М.)

UDC 571.27; 615.37 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-89-90

DEVELOPMENT OF A PLATFORM FOR ASSESSING THE EFFICIENCY OF THE IMMUNE RESPONSE TO A CANDIDATE VACCINE

A.M. Timofeeva, E.A. Litvinova, S.A. Dolgushin, S.E. Sedykh, G.A. Nevinsky

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090, st. Lavrentiev 8.
e-mail: anna.m.timofeeva@gmail.com

The platform has been developed for the detection of antibodies specific to immunogenic epitopes of the target protein in blood plasma. This platform is a convenient tool for screening candidate vaccines and selecting vaccines that stimulate the production of antibodies corresponding to a natural infectious agent.

Key words: screening platform, antibody screening, vaccine, antibodies, SARS-CoV-2, S-protein, COVID-19, infectious diseases, vaccine development.

In vaccine development, in addition to choosing an effective immunogen, speed of development is important, so a platform that can accelerate vaccine development is essential. Humoral immunity against viral infection depends on the ability of B-cells to generate a repertoire of antibodies that neutralize the virus. However, not every fragment of the viral protein leads to the production of such antibodies. The developed vaccine should stimulate the production of an antibody pattern similar to that in recovered patients. A significant problem in the development of new vaccines is the lack of technologies for analyzing how the spectrum of antibodies formed in vaccinated patients corresponds to antibodies in recovered patients. **The aim** of this work is to develop a platform for screening antibodies that are formed against various epitopes of the target protein as a result of immunization with various vaccines. As a result, an antibody screening system has been developed to compare the antibody repertoire in SARS-CoV-2 infection and immunization with different vaccines. The developed platform for screening is based on the enzyme immunoassay method using oligopeptides adsorbed in the wells of the tablet. A positive ELISA signal indicates that this region of the surface of the target protein is accessible to the immune system. The effectiveness of the developed platform was evaluated using the blood plasma of immunized mice (RBD, Sputnik V and KoviVac), as well as patients who recovered from COVID-19 and were vaccinated (Sputnik V and KoviVac). We used 19 oligopeptides corresponding to SARS-CoV-2 S protein antigenic determinants to develop the platform.

In mice immunized with RBD, we have shown the formation of antibodies recognizing the amino acid sequences corresponding to the oligopeptide located on the surface of the RBD. In mice immunized with Sputnik V and KoviVac, we found similar patterns of recognizable oligopeptide sequences. In the blood plasma of patients who recovered from COVID-19, we identified antibodies that recognize all the used oligopeptides. According to the model built in AlphaFold2, these regions are indeed located on the surface of the S protein. When immunized with vaccines, the profile of antibodies formed has similar features to the profile of antibodies that form as a result of past COVID-19.

Thus, the developed platform makes it possible to determine the presence of antibodies in blood plasma that are specific to the immunogenic epitopes of the target protein and to compare them with antibodies formed during vaccination. Comparison of the pool of antibodies that are formed in the body after an infectious disease and as a result of vaccination is a convenient tool for screening potential vaccines, and selecting those that stimulate the production of antibodies that match the natural infectious agent. Thus, the development of a screening platform, which is aimed at identifying the potential of a candidate vaccine, will help accelerate the development of new vaccines, including during a pandemic.

The study was supported by the Russian Science Foundation No.21-75-10105 (Timofeeva A.M.)

ОТ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ К ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЕ

FROM CELL TECHNOLOGIES TO PERSONALIZED MEDICINE

1. ПРИМЕНЕНИЕ МАГНИТНОЙ СЕЛЕКЦИИ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО УРОВНЮ ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЁРОВ
Н.С. Полякова,, О.Ф. Кандараков, А.В. Белявский 93

APPLICATION OF MAGNETIC SELECTION FOR SEPARATION OF CELL POPULATIONS DIFFERING IN THE EXPRESSION LEVELS OF SURFACE MARKERS
N.S. Polyakova, O.F. Kandarakov, A.V. Belyavsky 94

2. НОКАУТ TP53 ПРИВОДИТ К УВЕЛИЧЕНИЮ СКОРОСТИ МИГРАЦИИ И ИНДУКЦИИ ЭКСПРЕССИИ ЛАМИНИНА-5 В КЕРАТИНОЦИТАХ HACAT
Ромашин Д.Д., Кожин П.М., Костенко Ю.Б., Русанов А.Л., Лузгина Н.Г. 95

KNOCK OUT OF TP53 ENHANCED LAMININ-5 EXPRESSION AND MIGRATION RATE IN HACAT KERATIONOCYTES
D.D. Romashin, P.M. Kozhin, Yu.B. Kostenko, A.L. Rusanov, N.G. Luzgina 96

3. ПРИМЕНЕНИЕ БИОИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКТОВ ИЗ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ В КОЛЛАГЕНОВЫХ ГИДРОГЕЛЯХ ДЛЯ ТЕРАПИИ КИСТ СПИННОГО МОЗГА
Фурса Г. А., Чадин А.В., Воронова А.Д., Шишкина В.В., Андрецова С.С., Карсунцева Е.К., Каршиева С.Ш., Сенатов Ф.С., Степанова О. В., Чехонин В.П. 96

APPLICATION OF BIOENGINEERED CONSTRUCTS FROM OLFACTORY MUCOSA CELLS IN COLLAGEN HYDROGELS FOR THE TREATMENT OF SPINAL CORD CYSTS
G.A. Fursa, A.V. Chadin, A.D. Voronova, V.V. Shishkina, S.S. Andretsova, E.K. Karsuntseva, S.S. Karshieva, F.S. Senatov, O.V. Stepanova, V.P. Chekhonin 98

УДК 57.086.835, 602.1, 602.4 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-93-94

ПРИМЕНЕНИЕ МАГНИТНОЙ СЕЛЕКЦИИ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО УРОВНЮ ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЁРОВ

Н.С. Полякова[1*], О.Ф. Кандараков[1], А.В. Белявский[1,2]

[1] ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32, стр. 1
[2] ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия 117485, Москва, ул. Бутлерова, д. 5А
**e-mail: natae05@yandex.ru*

Исследована осуществимость разделения клеточных популяций с помощью магнитной селекции согласно уровню экспрессии поверхностных маркёров. Оценены эффекты магнитной селекции трансдуцированных клеток дозами магнитных микрочастиц от 0,5 до 80 мкл. Продемонстрирована возможность разделения клеточных популяций на субпопуляции с высокой и низкой экспрессией маркёров на основе двухэтапной схемы отбора.

Ключевые слова: ретровирусные векторы, трансдукция, LNGFR, EGFP, DsRed-Express2, MACS, магнитная селекция.

Магнитная селекция клеток в настоящее время используется в различных областях фундаментальных исследований и в медицине [1-3]. Преимущества метода включают скорость, простоту и возможность отбора большого количества клеток с высокой жизнеспособностью за короткое время без привлечения дорогостоящего оборудования. Однако подходы к магнитному отбору клеточных популяций, отличающихся уровнями экспрессии маркёров, в частности высокоэкспрессирующих популяций и популяций с низким уровнем экспрессии маркёров, до сих пор не были разработаны.

Целью исследования была разработка подходов к магнитной селекции и разделению клеток, различающихся по уровню экспрессии поверхностных маркёров.

Объектами исследования послужили клетки NIH 3T3, трансдуцированные бицистронными ретровирусными векторными конструкциями с флуоресцентными репортерными белками EGFP или DsRed-Express2, и низкоаффинным рецептором фактора роста нервов – LNGFR - в качестве маркёров отбора.

Для оценки эффектов магнитной селекции трансдуцированных клеток использовали дозы anti-LNGFR microbeads (MBs) в диапазоне от 0,5 до 80 мкл. Низкие дозы MBs способствовали удалению слабопозитивных клеток из популяции и повышению чистоты выбранной популяции, даже для образцов с низким начальным процентом положительных клеток. Отобранные клеточные фракции в результате характеризовались более высоким уровням экспрессии репортеров EGFP или DsRed-Express2. В то же время, высокие дозы MBs приводили к увеличению выхода и более репрезентативному представлению исходных профилей экспрессии после отбора. Используя двухэтапную схему отбора, основанную на последовательном применении низких и высоких доз MBs, мы также продемонстрировали возможность разделения трансдуцированных клеток, характеризующихся узким распределением уровней экспрессии, на высоко- и низкоэкспрессирующие субпопуляции.

Таким образом, в данной работе показана возможность простого отбора трансдуцированных клеток с высоким или низким уровнем экспрессии поверхностных маркёров, что, в свою очередь, существенно расширяет потенциал магнитной сортировки клеток и может открыть новые возможности в ряде биомедицинских применений.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (РНФ, проект № 18-14-00300).

Авторы сердечно благодарят Дэвида Балтимора, Бориса Фезе, Мозеса Чао и Индера Верма за любезно предоставленные плазмиды.

Литература:

1. Plouffe BD, Murthy SK, Lewis LH. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review. Reports on Progress in Physics. 2015. 78(1):016601.

2. Demin AM, Kandarakov OF, Belyavsky AV, Krasnov VP. Comparative study of L-Lys modification of gas-condensation and chemically obtained magnetic Fe3O4 nanoparticles for cell labeling. AIP Conference Proceedings. 2022. 2390, 030011.

3. Frenea-Robin M, Marchalot J. Basic principles and recent advances in magnetic cell separation. Magnetochemistry. 2022. 8:11.

UDC 57.086.835, 602.1, 602.4 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-93-94

APPLICATION OF MAGNETIC SELECTION FOR SEPARATION OF CELL POPULATIONS DIFFERING IN THE EXPRESSION LEVELS OF SURFACE MARKERS

N.S. Polyakova[1*], O.F. Kandarakov[1], A.V. Belyavsky[1,2]

[1] Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia 119991, Moscow, Vavilova, 32, bld.1
[2] Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia 117485, Moscow, Butlerova 5A
**e-mail: natae05@yandex.ru*

The feasibility of separating cell populations by the level of expression of surface markers has been investigated. The effects of magnetic selection of transduced cells with doses of magnetic microparticles from 0.5 to 80 µl were evaluated. The possibility of dividing cell populations into subsets with high and low expression of markers using a two-stage selection scheme has been demonstrated.

Keywords: retroviral vectors, transduction, LNGFR, EGFP, DsRed-Express2, MACS, magnetic selection.

Magnetic cell selection is currently used in various fields of research and in medicine [1-3]. The advantages of the method include speed, simplicity and the possibility of selecting a large number of cells with high viability in a short time without involving expensive equipment. However, approaches to magnetic selection of cell populations with different levels of marker expression, in particular high-expression populations and populations with low levels of marker expression, have not yet been developed.

The aim of the study was to develop approaches to magnetic cell selection and separation of cells differing in the surface marker expression levels.

The objects of the study were NIH 3T3 cells transduced with bicistronic retroviral vector constructs with fluorescent reporter proteins EGFP or DsRed-Express2, and low–affinity nerve growth factor receptor - LNGFR - as selection markers.

The effects of the magnetic selection of transduced cells with anti-LNGFR Micro Bead (MB) doses ranging from 0.5 to 80 µl have been assessed. Low doses of MBs contributed to the removal of weakly positive cells from the population and increased purity of the selected population, even for samples with a low initial percentage of positive cells, which in turn led to higher levels of expression of EGFP or DsRed-Express2 reporters in the selected cell fractions. At the same time, high doses of MBs led to an increase in yield and a more accurate representation of the initial expression profiles after selection. Using a two-stage selection scheme based on the sequential use of low and high doses of MBs, we also demonstrated the feasibility of separation of the transduced cells varying in the surface markers expression levels into high- and low-expressing subsets.

Thus, this study demonstrates a feasibility of simple selection of transduced cells with a high or low level of expression of surface markers, which, in turn, significantly expands the potential of magnetic cell sorting and may open up new opportunities in a number of biomedical applications.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant no. 18-14-00300).

The authors cordially thank David Baltimore, Boris Fehse, Moses Chao and Inder Verma for their kind gifts of plasmids.

References:

1. Plouffe BD, Murthy SK, Lewis LH. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review. Reports on Progress in Physics. 2015. 78(1):016601.

2. Demin AM, Kandarakov OF, Belyavsky AV, Krasnov VP. Comparative study of L-Lys modification of gas-condensation and chemically obtained magnetic Fe3O4 nanoparticles for cell labeling. AIP Conference Proceedings. 2022. 2390, 030011.

3. Frenea-Robin M, Marchalot J. Basic principles and recent advances in magnetic cell separation. Magnetochemistry. 2022. 8:11.

УДК 576.524 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-95-96

НОКАУТ TP53 ПРИВОДИТ К УВЕЛИЧЕНИЮ СКОРОСТИ МИГРАЦИИ И ИНДУКЦИИ ЭКСПРЕССИИ ЛАМИНИНА-5 В КЕРАТИНОЦИТАХ НАСАТ

Ромашин Д.Д., Кожин П.М., Костенко Ю.Б., Русанов А.Л., Лузгина Н.Г.

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича, Москва, Россия, 119121, ул. Погодинская, д. 10, стр.8
e-mail: dromashin@ibmc.msk.ru

Нокаут *TP53* в кератиноцитах HaCaT приводит к увеличению экспрессии субъединиц комплекса ламинина-5 (LAMB3, LAMC2) на уровне белка и мРНК. Клетки с нокаутом *TP53* характеризуются более высокой скоростью миграции и сниженной пролиферативной активностью по сравнению с клетками исходной линии.

Ключевые слова: кератиноциты, HaCaT, p53, *TP53*, ламинин-5, миграция.

Кератиноциты HaCaT представляют собой спонтанно-иммортализованную клеточную линию и достаточно точно воспроизводят ключевые свойства первичных кератиноцитов человека. Однако, применение данной клеточной линии в качестве альтернативы первичным кератиноцитам имеет определенные ограничения, в значительной степени обусловленные наличием двух мутаций приобретения функции (Gain-of-function) в гене *TP53*. В более ранних исследованиях было показано, что одним из наиболее заметных отличий кератиноцитов HaCaT от первичных кератиноцитов является пониженная экспрессия белков-субъединиц комплекса ламинина-5 (LAMA3, LAMB3, LAMC2), который играет важную роль в регуляции клеточной адгезии и миграции кератиноцитов [1]. Накопление ламинина-5 в кератиноцитах ассоциировано с восстановлением базальной мембраны и регенерацией повреждений.

Ранее нами была получена линия HaCaT с нокаутом гена *TP53* [2]. Анализ протеомных данных, полученных от клеток модифицированной и исходной линий HaCaT, выявил значительное увеличение уровня экспрессии белков комплекса ламинина-5 (LAMB3, LAMC2) в клетках с нокаутом *TP53*. Анализ уровня экспрессии генов *LAMA3, LAMB3* и *LAMC2* подтвердил результаты протеомного исследования: экспрессия анализируемых генов была повышена в клетках с нокаутом *TP53* в 1,5, 1,2 и 1,8 раз. При воздействии на клетки анализируемых линий TGF-β1 экспрессия *LAMB3* и *LAMC2* возрастала в клетках с нокаутом *TP53* в 2,1 и 2,2 раза соответственно, в то время как в клетках исходной линии экспрессия целевых генов не изменялась. Однако, воздействие TNF-α напротив, приводило к снижению экспрессии *LAMB3*/*LAMC2* в обеих линиях. При моделировании повреждения эпидермиса (scratch-тест) было показано, что скорость устранения дефекта в клетках с нокаутом *TP53* была значительно выше по сравнению с исходными клетками, что соотносится с данными литературы об участии белков комплекса ламинина-5 в регуляции миграции кератиноцитов и регенерации эпидермиса. Клетки полученной линии также характеризовались сниженной скоростью пролиферации, что соотносится с данными о том, что приобретенные в результате иммортализации мутации в *TP53* ассоциированы со скоростью роста и пролиферации.

Разработанная клеточная модель может найти применение для исследования функций p53 и его роли при патологиях кожи, а также для исследования белков комплекса ламинина-5 и их роли в регуляции миграции, клеточной адгезии и роста кератиноцитов.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800481-0)

Литература:

1. Sprenger A, Weber S, Zarai M, Engelke R, Nascimento JM, Gretzmeier C, Hilpert M, Boerries M, Has C, Busch H, Bruckner-Tuderman L, Dengjel J. Consistency of the proteome in primary human keratinocytes with respect to gender, age, and skin localization. Mol Cell Proteomics. 2013 Sep;12(9):2509-21.

2. Rusanov A, Romashin D, Kozhin P, Karagyaur M, Loginov D, Tikhonova O, Zgoda V, Luzgina N. Impact of p53 Knockout on Protein Data Set of HaCaT Cells in Confluent and Subconfluent Conditions. Data. 2022; 7(3):27.

UDC 576.524 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-95-96

KNOCK OUT OF TP53 ENHANCED LAMININ-5 EXPRESSION AND MIGRATION RATE IN HACAT KERATIONOCYTES

D.D. Romashin, P.M. Kozhin, Yu.B. Kostenko, A.L. Rusanov, N.G. Luzgina

Institute of biomedical chemistry,
119121, 10, Pogodinskaya street, Moscow, Russia
e-mail: dromashin@ibmc.msk.ru

TP53 knock out increased laminin-5 (LAMB3, LAMC2) expression on protein and mRNA levels. P53-defficient HaCaT cells have decreased proliferation rate and altered migration.

HaCaT is a spontaneously immortalized cell line derived from normal human keratinocytes. This cells are widely used as alternative to normal keratinocytes since they retain the core properties of primary cells. However, there are several limitations in application of HaCaT cells mainly related with two gain-of-function (GOF) mutations in both alleles of *TP53* gene. HaCaT cells notably differ from primary keratinocytes in laminin-5 expression, which plays pivotal role in regulation of migration and cell adhesion [1]. Increase of laminin-5 levels is associated with basal membrane reconstruction and wound healing.

Earlier we generated a *TP53* knock out cell line based on HaCaT keratinocytes [2]. Proteomic data obtained from parental and novel cell lines revealed significant increase of laminin-5 subunits LAMB3 and LAMC2 in *TP53*-deficient cells. These results were confirmed by mRNA expression analysis which revealed a significant increase of laminin-5 coding genes. The fold change of *LAMA3, LAMB3* and *LAMC2* mRNA levels was 1.5, 1.2 and 1.8, respectively. Exposure with TGF-β1 increased *LAMB3* and *LAMC2* expression in *TP53* knock out cells by 2,1 and 2,2 times, respectively. At the same time, no changes was observed in parental cell line. Exposure with TNF-α, in opposite, has led to downregulation of *LAMB3* and *LAMC2* mRNA levels in both lines. Scratch-test (wound modeling) has revealed higher migration rate in *TP53* knock out cells compared to the parental line, which is in line with the previous studies. The obtained results also highlight the role of laminin-5 in regulation of keratinocytes migration and wound closure. The *TP53*-defficient cells also had decreased proliferation rate in comparison with the parental line, confirming that HaCaT cells bear bro-growth mutations in *TP53*.

The generated model may find a broad range of applications in the field of p53 biology and its role in skin pathologies. The novel cell line can also be handful to investigate laminin-5 functions and its role in regulation of migration, cell adhesion and growth of keratinocytes.

The study was carried out as part of the Program for fundamental research in the Russian Federation for the long-term period (2021–2030) (№ 122022800481-0).

References:

1. *Sprenger A, Weber S, Zarai M, Engelke R, Nascimento JM, Gretzmeier C, Hilpert M, Boerries M, Has C, Busch H, Bruckner-Tuderman L, Dengjel J. Consistency of the proteome in primary human keratinocytes with respect to gender, age, and skin localization. Mol Cell Proteomics. 2013 Sep;12(9):2509-21.*
2. *Rusanov A, Romashin D, Kozhin P, Karagyaur M, Loginov D, Tikhonova O, Zgoda V, Luzgina N. Impact of p53 Knockout on Protein Data Set of HaCaT Cells in Confluent and Subconfluent Conditions. Data. 2022; 7(3):27.*

УДК 57.084.1 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-96-98

ПРИМЕНЕНИЕ БИОИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКТОВ ИЗ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ В КОЛЛАГЕНОВЫХ ГИДРОГЕЛЯХ ДЛЯ ТЕРАПИИ КИСТ СПИННОГО МОЗГА

Фурса Г.А.[1,2], Чадин А.В.[1], Воронова А.Д.[1], Шишкина В.В.[1], Андрецова С.С.[1], Карсунцева Е.К.[1], Каршиева С.Ш.[3], Сенатов Ф.С.[3], Степанова О.В.[1], Чехонин В.П.[1,2]

[1] ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России, Москва, Россия
119034, Москва, Кропоткинский переулок, д. 23
[2] ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия
119997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

[3] НИТУ МИСИС, Москва, Россия
119049, Москва, Ленинский пр-кт, д. 4, стр. 1
E-mail: gregorii.fursa@gmail.com

В кисту спинного мозга были трансплантированы обкладочные клетки из обонятельной выстилки в гидрогеле из нативного крысиного коллагена первого типа. С помощью тестов *in vitro* была изучена выживаемость клеток в коллагеновом гидрогеле. Было показано, что коллагеновый гидрогель замедляет пролиферацию *in vitro* и не способствует увеличению эффективности обкладочных клеток в терапии кист спинного мозга.

Ключевые слова: коллаген первого типа; обкладочные клетки; обонятельная выстилка; кисты спинного мозга; клеточная терапия; регенеративная медицина.

Лечение травм спинного мозга — актуальный вопрос современной медицины. Перспективным направлением в данной области являться применение клеточной терапии. Однако известно, что при трансплантации клеток они могут гибнуть в течение непродолжительного времени. Для повышения выживаемости клеток используются трехмерные гидрогели, которые могут имитировать естественное окружение клеток [1]. Особый интерес вызывают гидрогели на основе коллагена первого типа, поскольку он является самым распространённым в организме млекопитающих.

Целью данной работы является оценка эффективности применения биоинженерных конструктов из клеток обонятельной выстилки в коллагеновых гидрогелях для терапии экспериментальных кист спинного мозга.

Обкладочные клетки из обонятельной выстилки человека были получены по разработанному нами протоколу [2]. Моделирование контузионной травмы спинного мозга проводили посредством удара по спинному мозгу с силой 2 Ньютона. Образование кисты подтверждали методом МРТ через 4 недели после травмы. В ходе эксперимента исследовали коллагеновые гидрогели с концентрацией 1 мг/мл и 4 мг/мл. В тестах *in vitro* оценивали выживаемость клеток, меченных прижизненным мембранным красителем PKH-26, путем подсчета клеток в 10 полях зрения. Гидрогели смешивали с 1 миллионом меченых обкладочных клеток. Биоинженерный препарат трансплантировали в объёме 10 мкл. В качестве контроля вводили то же количество клеток без гидрогелей и 10 мкл DMEM:F12 (1:1). Терапевтическая эффективность препаратов была оценена по улучшению двигательной активности задних конечностей крыс в течение 4 недель с помощью BBB-тестов.

В тестах in vitro коллагеновый гидрогель снижал пролиферацию обкладочных клеток с образованием апоптотических телец на 5 день культивирования. Было показано, что биоинженерный препарат с содержанием коллагена 1 мг/мл показал эффективность ниже контрольной группы из обкладочных клеток. Биоинженерный препарат с содержанием коллагена 4 мг/мл показал эффективность на уровне контрольной группы из обкладочных клеток.

Биоинженерные конструкты на основе коллагенового гидрогеля и клеток обонятельной выстилки не превосходят по терапевтической эффективности обкладочные клетки при терапии кист спинного мозга. Это может быть связано с негативным влиянием коллагена на пролиферацию обкладочных клеток и требует поиска другого гидрогеля.

Работа выполнена при поддержке Государственным заданием № 123022000056-7 от 10.04.2023 г.

Литература:

1. *Stepanova OV, Voronova AD, Chadin AV, Valikhov MP, Semkina AS, Karsuntseva EK, Chekhonin IV, Shishkina VS, Reshetov IV, Chekhonin VP. Efficiency of human olfactory ensheathing cell transplantation into spinal cysts to improve mobility of the hind limbs. Stem Cells and Development. 2019;28(18): 1253–1263*
2. *Zhong J., Chan A., Morad L., Kornblum H. I., Guoping Fan, Carmichael S. T. Hydrogel Matrix to Support Stem Cell Survival After Brain Transplantation in Stroke // Neurorehabil Neural Repair. 2010;24(7): 636–644.*

UDC 57.084.1 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-96-98

APPLICATION OF BIOENGINEERED CONSTRUCTS FROM OLFACTORY MUCOSA CELLS IN COLLAGEN HYDROGELS FOR THE TREATMENT OF SPINAL CORD CYSTS

G.A. Fursa[1,2], A.V. Chadin[1], A.D. Voronova[1], V.V. Shishkina[1], S.S. Andretsova[1], E.K. Karsuntseva[1], S.S. Karshieva[3], F.S. Senatov[3], O.V. Stepanova[1], V.P. Chekhonin[1,2]

[1] V.P. Serbsky National Medical Research Center for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia 119034, Moscow, Kropotkinsky lane, 23
[2] N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia 119997, Moscow, st. Ostrovityanova, 1
[3] National University of Science and Technology "MISIS", Moscow, Russia 119049, Moscow, Leninskiy pr. 4s1
E-mail: gregorii.fursa@gmail.com

Ensheathing cells from the olfactory mucosa were transplanted into the cyst of the spinal cord in a hydrogel from native rat collagen of the first type. With *in vitro* tests, the survival of cells in collagen hydrogel was studied. It has been shown that collagen hydrogel slows down proliferation *in vitro* and does not increase the effectiveness of ensheathing cells in the treatment of spinal cord cysts.

Keywords: collagen of the first type; ensheathing cells; olfactory mucosa; spinal cord cysts; cell therapy; regenerative medicine.

Treatment of spinal cord injuries is a topical issue of modern medicine. A promising direction in this area is the use of cell therapy. However, it is known that when cells are transplanted, they can die within a short time. To improve cell survival, three-dimensional hydrogels are used, which can mimic the natural environment of cells [1]. Of particular interest are hydrogels based on type 1 collagen since it is the most common in the body of mammals.

The aim of this work is to evaluate the effectiveness of using bioengineered constructs from olfactory mucosa cells in collagen hydrogels for the treatment of experimental spinal cord cysts.

Ensheathing cells from the human olfactory mucosa were obtained according to our protocol [2]. Modeling of contusion spinal cord injury was performed by hitting the spinal cord with a force of 2 Newtons. Cyst formation was confirmed by MRI 4 weeks after injury. During the experiment, collagen hydrogels with a concentration of 1 mg/ml and 4 mg/ml were studied. *In vitro* tests assessed the survival of cells labeled with intravital membrane dye PKH-26 by counting cells in 10 fields of view. The hydrogels were mixed with 1 million labeled ensheathing cells. The bioengineered preparation was transplanted in a volume of 10 µl. As a control, the same number of cells without hydrogels and 10 µl of DMEM:F12 (1:1) were injected. The therapeutic efficacy of the drugs was evaluated by improving the motor activity of the hind limbs of rats within 4 weeks using BBB tests.

In *in vitro* tests, collagen hydrogel reduced the proliferation of ensheathing cells with the formation of apoptotic bodies on day 5 of cultivation. It was shown that a bioengineered preparation with a collagen content of 1 mg/ml showed an efficiency lower than the control group of ensheathing cells. A bioengineered preparation with a collagen content of 4 mg/ml showed efficiency at the level of the control group of ensheathing cells.

Bioengineering constructs based on collagen hydrogel and olfactory mucosa cells are not superior in therapeutic efficacy to ensheathing cells in the treatment of spinal cord cysts. This may be due to the negative effect of collagen on the proliferation of ensheathing cells and requires the search for another hydrogel.

The work was supported by State Assignment No. 123022000056-7 dated April 10, 2023.

References:

1. *Stepanova OV, Voronova AD, Chadin AV, Valikhov MP, Semkina AS, Karsuntseva EK, Chekhonin IV, Shishkina VS, Reshetov IV, Chekhonin VP. Efficiency of human olfactory ensheathing cell transplantation into spinal cysts to improve mobility of the hind limbs. Stem Cells and Development. 2019;28(18): 1253–1263*
2. *Zhong J., Chan A., Morad L., Kornblum H. I., Guoping Fan, Carmichael S. T. Hydrogel Matrix to Support Stem Cell Survival After Brain Transplantation in Stroke // Neurorehabil Neural Repair. 2010;24(7): 636–644.*

БИОЭКОНОМИКА

BIOECONOMICS

БИОАНАЛИТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ: НОВЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ И СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

BIOANALYTIC TECHNOLOGIES IN MEDICINE AND AGRICULTURE

1. ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В МОЛОКЕ
Н.А. Бызова, А.А. Горбатов, С.Ф. Бикетов, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев 101

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS
FOR THE DETECTION OF PATHOGENIC MICROORGANISMS IN MILK
N.A. Byzova, A.A. Gorbatov, S.F. Biketov, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev 102

2. РАЗРАБОТКА ИММУНОАНАЛИТИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ
ДЛЯ ЭКСПРЕССНОГО КОНТРОЛЯ СЫРЬЕВОГО СОСТАВА МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ
Зверева Е.А., Гендриксон О.Д., Сафенкова И.В., Дзантиев Б.Б., Жердев А.В. 103

DEVELOPMENT OF IMMUNOANALYTICAL AND MOLECULAR GENETIC TEST SYSTEMS
FOR EXPRESS CONTROL OF RAW MATERIAL COMPOSITION OF MEAT PRODUCTS
E.A. Zvereva, O.D. Hendrickson, I.V. Safenkova, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev 104

УДК 577.11 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-101-103

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В МОЛОКЕ

Н.А. Бызова[1], А.А. Горбатов[2], С.Ф. Бикетов[2], А.В. Жердев[1], Б.Б. Дзантиев[1]

[1] ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33
nbyzova@inbi.ras.ru
[2] ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Россия
142279, Московская обл., п. Оболенск, тер. «Квартал А», д. 24

Краткое содержание
Разработаны иммунохроматографические тест-системы для выявления в молоке приоритетных патогенов – *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 и *Listeria monocytogenes*. На примере выявления *S. typhimurium* сопоставлены режимы взаимодействия иммунореагентов. Тест-системы позволяют выявлять до 3 x 10^4 КОЕ/мл микроорганизмов за 10–20 мин.

Ключевые слова: взаимодействия антиген-антитело, иммунохроматография, наночастицы, молоко, патогенные контаминанты

Для обеспечения безопасности продуктов питания необходимы средства быстрого внелабораторного контроля присутствия в них опасных для здоровья контаминант. Рациональным подходом для достижения этой цели является применение иммунохроматографических тест-систем (ИХТС), хорошо зарекомендовавших себя при решении разнообразных задач медицинской диагностики. ИХТС представляют собой мультимембранные композиты (тест-полоски) с предварительно нанесенными и высушенными реагентами. Контакт тест-полоски с жидкой пробой инициирует все аналитические процессы и быстрое формирование иммунных комплексов в контрольной и (или) тестовой зонах, выявляемое с помощью их окрашивания нанодисперсными метками.

Задачей проведенной работы было создание ИХТС для экспрессного выявления приоритетных патогенов, контролируемых в молоке, – *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 и *Listeria monocytogenes*.

Получены препараты наночастиц золота (НЧЗ) со средним диаметром 40 нм и их конъюгаты с антителами (НЧЗ–Ат) против выявляемых патогенов. Сопоставлены по антигенсвязывающей способности конъюгаты разного состава. Установлены концентрации иммунореагентов и условия их нанесения на мембраны тест-полоски, обеспечивающие минимальные пределы обнаружения патогенов (см. таблицу).

На примере определения *S. typhimurium* проведено сравнение трех схем иммунохроматографии: 1) с нанесенными на тест-полоску всех используемых иммунореагентов; 2) с инкубацией пробы и конъюгата НЧЗ–Ат, предшествующей иммунохроматографии; 3) с последовательным прохождением по тест-полоске пробы и конъюгата НЧЗ–Ат. Аналитические характеристики тест-систем, представленные в таблице, демонстрируют преимущество первой схемы.

Таблица. Аналитические характеристики разработанных ИХТС

Целевой аналит (патоген)	Схема проведения иммунохроматографии	Предел обнаружения, КОЕ/мл	Точность анализа, %	Время анализа, мин
Salmonella typhimurium	С полностью нанесенными реагентами	3 x 10^4	1,5–2,5	10
	С прединкубацией	1 x 10^5	3,4–5,0	15
	С последовательным прохождением реагентов	3 x 10^5	3,5–8,5	20
Escherichia coli O157:H7	С полностью нанесенными реагентами	2 x 10^6	1,2–2,5	10
Listeria monocytogenes	С полностью нанесенными реагентами	3 x 10^5	1,6–2,7	10

Проведена апробация разработанных тест-систем на пробах молока с содержанием жира от 1,5 до 4,0%. Установлено, что разведение до уровня жирности 1,0% обеспечивает быструю и простую подготовку проб для последующего полного иммунохроматографического выявления патогенов. Определение содержания патогенов в молоке с помощью разработанных ИХТС характеризовалось точностью в пределах от 1,2% до 8,5%.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант 23-16-10011, разработка биоаналитических систем) и Государственным заданием НИОКР 3.2 (получение бактериальных антигенных препаратов).

UDC 577.11 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-101-103

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS FOR THE DETECTION OF PATHOGENIC MICROORGANISMS IN MILK

N.A. Byzova[1], A.A. Gorbatov[2], S.F. Biketov[2], A.V. Zherdev[1], B.B. Dzantiev[1]

[1] Federal Research Centre "Fundamental of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
Leninsky prospect, bld. 33, 119071 Moscow
nbyzova@inbi.ras.ru
[2] State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia
Territory "Quarter A", bld. 24, Moscow region, 142279 Obolensk

Summary
Immunochromatographic test systems have been developed to detect priority pathogens in milk – *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. On the example of S. typhimurium detection, modes of immunoreagents interactions were compared. The test systems can detect up to 3 x 10^4 CFU/mL of microorganisms in 10–20 min.

Keywords: antigen-antibody interactions, immunochromatography, nanoparticles, milk, pathogenic contaminants

To ensure the safety of food products, tools for rapid non-laboratory control of the presence of hazardous contaminants are needed. A rational approach to achieve this goal is the use of immunochromatographic test systems (ICTS), which have proven themselves in solving various tasks of medical diagnostics. ICTS are multimembrane composites (test-strips) with pre-applied and dried reagents. The contact of the test-strip with a liquid sample initiates all analytical processes and rapid formation of immune complexes in control and (or) test zones, which is detected by their coloration with nanodispersed labels.

The aim of this work was to create ICTS for rapid detection of priority pathogens controlled in milk – *Salmonella typhimurium, Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*.

Preparations of gold nanoparticles (GNP) with an average diameter of 40 nm and their conjugates with antibodies (GNP–Ab) against the detected pathogens were obtained. The conjugates of different composition were compared in terms of antigen-binding ability. The concentrations of immunoreagents and the conditions for their application on the membranes of the test-strips, which ensure the minimum limits of pathogens' detection, have been established (see table).

Table. Analytical characteristics of the developed ICTS

Target analyte (pathogen)	Scheme of immunochromatography	Limit of detection, CFU/ml	Analysis accuracy, %	Analysis time, min
Salmonella typhimurium	All immunoreagents are applied to the test-strip	3 x 10^4	1,5–2,5	10
	With prior incubation of the sample and GNP–Ab conjugate	1 x 10^5	3,4–5,0	15
	With sequential passage of the sample and the GNP–Ab conjugate along the test-strip	3 x 10^5	3,5–8,5	20
Escherichia coli O157:H7	All immunoreagents are applied to the test-strip	2 x 10^6	1,2–2,5	10
Listeria monocytogenes	All immunoreagentsare applied to the test-strip	3 x 10^5	1,6–2,7	10

On the example of *S. typhimurium* detection, three schemes for conducting immunochromatography were compared: 1) with all immunoreagents applied on the test-strip; 2) with incubation of the sample and GNP–Ab conjugate, prior to immunochromatography; 3) with sequential passage of the sample and the GNP–Ab conjugate along the test-strip. The analytical characteristics of the test systems presented in the table demonstrate the advantage of the first scheme.

The developed test-systems were approbated out on milk samples with a fat content from 1.5 to 4.0%. It was found that dilution to a fat content of 1.0% provides quick and easy sample preparation for subsequent complete immunochromatographic detection of the pathogens. Determination of the pathogens content in milk using the developed ICTS was characterized by an accuracy ranging from 1.2% to 8.5%.

The work was supported by the Russian Science Foundation (grant 23-16-10011, development of bioanalytical systems) and the State R&D Task 3.2 (obtaining bacterial antigenic preparations).

УДК 577.1; 577.1.08 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-103-105

РАЗРАБОТКА ИММУНОАНАЛИТИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ЭКСПРЕССНОГО КОНТРОЛЯ СЫРЬЕВОГО СОСТАВА МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ

Зверева Е.А., Гендриксон О.Д., Сафенкова И.В., Дзантиев Б.Б., Жердев А.В.

Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2
e-mail: zverevaea@yandex.ru

Разработан комплекс иммуноаналитических и молекулярно-генетических тест-систем для экспрессной идентификации и оценки содержания сырья, используемого при изготовлении мясных продуктов. Результаты апробации тест-систем позволяют рекомендовать их для быстрого и простого выявления отклонений мясосодержащих продуктов от заявленных рецептур.

Ключевые слова: мясные продукты, аутентичность продукции, иммунохроматографический анализ.

Интерес потребителей к составу продуктов питания постоянно растет. Употребление фальсифицированных мясных продуктов может нарушать религиозные требования или быть опасным для здоровья. Поэтому необходимы экспрессные методы тестирования, позволяющие во внелабораторных условиях оперативно выявлять источники сырья, использованного производстве мясных продуктов. Удобным средством контроля состава и качества мясных продуктов является иммунохроматографический анализ (ИХА), который позволяет быстро и эффективно, без дополнительного оборудования идентифицировать разные виды сырья и проводить оценку их содержания.

Нами разработан ряд иммунохроматографических тест-систем для специфического выявления источников мяса в мясных продуктах с использованием в качестве биомаркеров миоглобина (обнаружение свинины), видоспецифических иммуноглобулинов (обнаружение свиного, бараньего или куриного мяса), тропонина I (обнаружение мяса млекопитающих). Разработана молекулярно-генетическая методика тестирования для выявления добавок в пищевые продукты свиного и куриного сырья, основанная на сочетании рекомбиназной полимеразной амплификации и ИХА. В качестве метки для обеспечения стабильного и воспроизводимого результата, однозначно оцениваемого невооруженным глазом, в тест-системах использовались наночастицы золота.

Для высокочувствительного иммунохимического контроля присутствия примесей свинины реализован вариант иммунохроматографии с использованием в качестве метки нанозима. Наночастицы состава Au@Pt были конъюгированы с антителами, а после их связывания в составе иммунных комплексов регистрировалась пероксидазоподобная активность метки с трансформацией хромогенного субстрата. Усиление интенсивности окрашивания зон связывания позволило до 30 раз снизить предел обнаружения по сравнению с традиционной схемой иммунохроматографии, основанной на использовании наночастиц золота. Тест-система позволяет выявлять до 0,005% примесей свинины в пищевых продуктах.

Разработанные монопараметрические иммунохроматографические тест-системы были объединены в различные варианты мультиплексных тест-систем для одновременного мониторинга нескольких компонентов, что повышает информативность и производительность контроля. Разработана тест-система для

экспресс-определения общего содержания мяса животных разных видов в мясных продуктах с использованием в качестве биомаркеров скелетного тропонина I (мясо млекопитающих) и IgY (мясо птиц). Кроме того, реализованы тест-системы для одновременного выявления IgY и овальбумина (обнаружение куриного мяса и яичного белка – соотношение компонентов в пищевых продуктах, не контролируемое молекулярно-генетическими методами), одновременного выявления IgY и миоглобина (обнаружение куриного и свиного мяса, наиболее часто используемого для фальсифицирующих замен заявленного дорогостоящего сырья).

Проведенная апробация тест-систем показала их пригодность для характеристики как сырых мясных смесей, так и готовых мясных продуктов (после температурной и ферментативной обработки). Эти результаты позволяют рекомендовать разработанные тест-системы для быстрого и простого выявления отклонений мясосодержащих продуктов от заявленных рецептур.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 19-16-00108).

UDC 577.1; 577.1.08 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-103-105

DEVELOPMENT OF IMMUNOANALYTICAL AND MOLECULAR GENETIC TEST SYSTEMS FOR EXPRESS CONTROL OF RAW MATERIAL COMPOSITION OF MEAT PRODUCTS

E.A. Zvereva, O.D. Hendrickson, I.V. Safenkova, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119071, Moscow, Leninsky prospect 33/2
e-mail: zverevaea@yandex.ru

A complex of immunoanalytical and molecular genetic test systems has been developed for express identification and assessment of the content of raw materials used in the manufacture of meat products. The results of approbation of test systems allow us to recommend them for quick and easy detection of deviations of meat-containing products from the declared recipes.

Keywords: meat products, product authenticity, immunochromatographic analysis.

Consumer interest in the composition of food products is constantly growing. Consumption of adulterated meat products may violate religious requirements or be hazardous to health. Therefore, rapid testing methods are needed that allow, under extralaboratory conditions, to quickly identify the sources of raw materials used in the production of meat products. A convenient means of monitoring the composition and quality of meat products is immunochromatographic analysis (ICA), which allows you to quickly and efficiently, without additional equipment, identify different types of raw materials and evaluate their content.

We have developed a number of immunochromatographic test systems for the specific detection of meat sources in meat products using myoglobin (detection of pork), species-specific immunoglobulins (detection of pork, sheep or chicken meat), troponin I (detection of mammalian meat) as biomarkers. A molecular genetic testing technique has been developed for the detection of additives in food products of pork and chicken raw materials, based on a combination of recombinase polymerase amplification and ICA. Gold nanoparticles were used as a label to ensure a stable and reproducible result, unambiguously assessed by the naked eye, in the test systems.

For highly sensitive immunochemical monitoring of the presence of pork impurities, a variant of immunochromatography was implemented using nanozyme as a label. Au@Pt nanoparticles were conjugated with antibodies, and after their binding in the composition of immune complexes, the peroxidase-like activity of the label was recorded with the transformation of the chromogenic substrate. The increased intensity of staining of the binding zones made it possible to reduce the detection limit by up to 30 times compared to the traditional scheme of immunochromatography based on the use of gold nanoparticles. The test system allows you to detect up to 0.005% of pork impurities in food products.

The developed monoparametric immunochromatographic test systems were combined into various multiplex test systems for simultaneous monitoring of several components, which increases the information content and performance of control. A test system has been developed for express determination of the total content of animal meat of different species in meat products using skeletal troponin I (mammalian meat) and IgY (poultry meat) as biomarkers. In addition, test systems have been implemented for the simultaneous detection of IgY and ovalbumin

(detection of chicken meat and egg protein - the ratio of components in food products not controlled by molecular genetic methods), the simultaneous detection of IgY and myoglobin (detection of chicken and pork meat, the most commonly used for falsifying replacements of declared expensive raw materials).

The testing of test systems showed their suitability for characterizing both raw meat mixtures and finished meat products (after thermal and enzymatic treatment). These results allow us to recommend the developed test systems for quick and easy detection of deviations of meat-containing products from the declared recipes.

This investigation was financially supported by the Russian Scientific Foundation (project No 19-16-00108).

БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

BIOCATALYSIS AND TECHNOLOGIES

1. ИНТЕНСИФИКАЦИЯ АНАПЛЕРОТИЧЕСКОГО ФОРМИРОВАНИЯ ЩАВЕЛЕВОУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ СПОСОБСТВУЕТ СИНТЕЗУ АДИПИНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ГЛЮКОЗЫ ПО ОБРАЩЕНОМУ ПУТИ БЕТА-ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ РЕКОМБИНАТНЫМ ШТАММОМ ESCHERICHIA COLI
Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г. 108

INTENSIFICATION OF ANAPLEROTIC FORMATION OF OXALOACETIC ACID CONTRIBUTES TO THE SYNTHESIS OF ADIPIC ACID FROM GLUCOSE THROUGH THE INVERTED FATTY ACID BETA-OXIDATION BY RECOMBINATNT ESCHERICHIA COLI STRAIN
A.Yu. Gulevich, A.Yu. Skorokhodova, V.G. Debabov 109

2. ПЕРСПЕКТИВЫ ВКЛЮЧЕНИЯ МЕТАЛЛСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ И ФЕРМЕНТОВ В СОСТАВ ПРОТИВОГРИБКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ
Ефременко Е.Н., Маслова О.В., Лягин И.В., Асланлы А.Г., Сенько О.В., Степанов Н.А., Домнин М.В., Гайдамака С.Н., Агаева М.У., Гайдамака А.О. 110

PROSPECTS FOR THE INCLUSION OF METAL-CONTAINING COMPOUNDS AND ENZYMES IN THE COMPOSITION OF ANTIFUNGALS
E.N. Efremenko, O.V. Senko, A.G. Aslanli, N.A. Stepanov, I.V. Lyagin, M.V. Domnin, S.N. Gaydamaka, M.U. Agaeva, A.O. Gaydamaka, O.V. Maslova 111

УДК 577.121 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-108-109

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ АНАПЛЕРОТИЧЕСКОГО ФОРМИРОВАНИЯ ЩАВЕЛЕВОУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ СПОСОБСТВУЕТ СИНТЕЗУ АДИПИНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ГЛЮКОЗЫ ПО ОБРАЩЕНОМУ ПУТИ БЕТА-ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ РЕКОМБИНАТНЫМ ШТАММОМ ESCHERICHIA COLI

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*

Показан позитивный эффект повышенной экспрессии генов нативной фосфоенолпируваткарбоксилазы и гетерологичной пируваткарбоксилазы на биосинтез адипиновой кислоты рекомбинантным штаммом *Escherichia coli*, конвертирующим глюкозу в целевой продукт по обращенному бета-окислению жирных кислот в режиме полноклеточного биокатализатора

Ключевые слова: адипиновая кислота, бета-окисление жирных кислот, *Escherichia coli*, полноклеточный биокатализатор

Адипиновая кислота - промышленно значимый химикат, способный служить удобным синтоном для получения широкого спектра веществ с высокой добавленной стоимостью, таких как любриканты, пластификаторы и фармацевтические субстанции. Большая часть адипиновой кислоты, ежегодно производящейся в объемах превышающих 3,5 миллиона тонн, используется для получения ее важнейшего производного - нейлона-6,6. В настоящее время адипиновую кислоту получают нефтехимическим синтезом, однако, биотехнологическое производство целевого соединения могло бы составить экологически- и экономически- оправданную альтернативу традиционному подходу.

Микроорганизмы, обладающие природной способностью к биосинтезу адипиновой кислоты, неизвестны. Тем не менее, в последние годы показана возможность формирования целевого соединения рекомбинантными штаммами микробов при реализации в них функциональности тех или иных искусственных биосинтетических путей. Так, ранее сконструированный полноклеточный биокатализатор *E. coli* MG1655 *lacI*^{Q}, *ΔackA-pta*, *ΔpoxB*, *ΔldhA*, *ΔadhE*, P_{L}-$SD_{\varphi 10}$-*atoB*, $P_{trc\text{-}ideal\text{-}4}$-$SD_{\varphi 10}$-*fadB*, *ΔfadE*, P_{L}-$SD_{\varphi 10}$-*tesB*, *ΔyciA*, $P_{trc\text{-}ideal\text{-}4}$-$SD_{\varphi 10}$-*fabI*, P_{L}-$SD_{\varphi 10}$-paaJ, *ΔaceBAK*, *ΔglcB* был способен к формированию из глюкозы до ~330 мкМ адипиновой кислоты по обращенному пути бета-окисления жирных кислот. Вместе с тем, соответствующий рекомбинантный штамм конвертировал более половины потребленного углеродного субстрата в пировиноградную кислоту с выходом, составляющим 0,53 моль/моль. В первую очередь, это могло свидетельствовать о сниженной эффективности вовлечения гликолитических предшественников в функционирование цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), снабжающего клетку необходимым для биосинтеза адипиновой кислоты сукцинил-КоА. Значительная побочная секреция штаммом уксусной кислоты указывала на достаточный уровень формирования в клетке ацетил-КоА и, таким образом, предполагала дефицит в клетках рекомбинанта щавелевоуксусной кислоты (ЩУК), образующейся при карбоксилировании трехуглеродных продуктов гликолиза. Повышение доступности CO2, за счет увеличения концентрации растворенного в среде бикарбоната не оказывало позитивного эффекта на синтез рекомбинантом целевого соединения. Усиление экспрессии гена *ppc*, кодирующего нативную фосфоенолпируваткарбоксилазу, обеспечивало рост продукции адипиновой кислоты в штамме в 1,2 раза, до ~390 мкМ, на фоне снижения секреции пировиноградной кислоты в 2,2 раза. При экспрессии гена гетерологичной пируваткарбоксилазы *Bacillus subtilis*, *pycA*, накопление пировиноградной кислоты штаммом падало в 3 раза, тогда как уровень биосинтеза адипиновой кислоты достигал 0,5 мМ, возрастая в 1,5 раз.

Полученные данные свидетельствовали о пропорциональном снижении накопления штаммом пировиноградной кислоты, интенсификации ЦТК и росте формирования сконструированным биокатализатором адипиновой кислоты. Таким образом, повышение интенсивности анаплеротического формирования ЩУК может рассматриваться в качестве перспективного подхода для улучшения биосинтетических характеристик штаммов, способных к конверсии глюкозы в адипиновую кислоту по обращенному бета-окислению жирных кислот.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (проект № 22-14-00040).

UDC 577.121 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-108-109

INTENSIFICATION OF ANAPLEROTIC FORMATION OF OXALOACETIC ACID CONTRIBUTES TO THE SYNTHESIS OF ADIPIC ACID FROM GLUCOSE THROUGH THE INVERTED FATTY ACID BETA-OXIDATION BY RECOMBINATNT ESCHERICHIA COLI STRAIN

A.Yu. Gulevich, A.Yu. Skorokhodova, V.G. Debabov

*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 positive effect of enhanced expression of native phosphoenolpyruvate carboxylase and heterologous pyruvate carboxylase genes on biosynthesis of adipic acid by recombinant *Escherichia coli* strain converting glucose to the target product through the inverted fatty-acid beta-oxidation pathway in whole-cell biocatalyst mode has been demonstrated

Key words: adipic acid, fatty acid beta-oxidation, *Escherichia coli*, whole-cell biocatalyst

Adipic acid is an industrially valuable chemical, which can serve as a convenient synthon for the synthesis of an array of high value-added substances, such as lubricants, plasticizers, and pharmaceuticals. Meanwhile, most of adipic acid produced annually in amounts exceeding 3.5 million tons is used to obtain its key derivative, nylon-6,6. At present, adipic acid is produced petrochemically, although the bio-based production of the target compound could represent an ecologically- and environmentally- reasonably alternative.

Up to date, no microorganisms possessing natural capacity to synthesize adipic acid were found. Nevertheless, in recent years the feasibility of target substance formation by recombinant microbial strains upon providing in the cells of functionality of artificial biochemical pathways has been shown. The previously engineered whole-cell biocatalyst *E. coli* MG1655 *lacI*^{Q}, *ΔackA-pta*, *ΔpoxB*, *ΔldhA*, *ΔadhE*, P_{L}-$SD_{\varphi 10}$-*atoB*, $P_{trc\text{-}ideal\text{-}4}$-$SD_{\varphi 10}$-*fadB*, *ΔfadE*, P_{L}-$SD_{\varphi 10}$-*tesB*, *ΔyciA*, $P_{trc\text{-}ideal\text{-}4}$-$SD_{\varphi 10}$-*fabI*, P_{L}-$SD_{\varphi 10}$-paaJ, *ΔaceBAK*, *ΔglcB* was able to produce from glucose up to ~330 μM adipic acid through the inverted fatty-acid beta-oxidation pathway. Concomitantly, the respective recombinant converted more than half of the carbon substrate to pyruvic acid with the yield constituting 0.53 mol/mol. Primarily, it could indicate the decreased efficiency of the involvement of glycolytic precursors in the functioning of the tricarboxylic acid cycle (TCA), supplying cell with succinyl-CoA required for adipic acid biosynthesis. Notable by-production of acetic acid by the strain indicated sufficient level of acetyl-CoA formation, suggesting, therefore, deficiency in oxaloacetic acid (OAA) formed upon the carboxylation of three-carbon glycolytic products. Increasing of CO2 availability by elevating of dissolved bicarbonate concentration failed to effect the biosynthesis of the target product by the engineered strain. The enhancement of the expression of the *ppc* gene encoding native phosphoenolpyruvate carboxylase led to the adipic acid production increased up to ~1.2 times, to ~390 μM, with the concomitant 2.2-fold decrease in pyruvate secretion. Upon the expression of heterologous pyruvate carboxylase gene, *pycA* from *Bacillus subtilis*, the accumulation of pyruvic acid by the strain dropped 3-times, while the level of adipic acid biosynthesis reached nearly 0,5 mM, increasing 1.5-times.

The data obtained indicated the proportional decrease in pyruvate accumulation by the strain, the TCA cycle intensification and the enhancement of adipic acid biosynthesis by the engineered biocatalyst. Thus, the increasing of the intensity of anaplerotic OAA formation could be suggested an approach to improve the biosynthetic characteristics of the strains capable of converting glucose to adipic acid through the inverted fatty-acid beta-oxidation.

Funding: The work was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project № 22-14-00040).

УДК 615.282 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-110-111

ПЕРСПЕКТИВЫ ВКЛЮЧЕНИЯ МЕТАЛЛСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ И ФЕРМЕНТОВ В СОСТАВ ПРОТИВОГРИБКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Ефременко Е.Н., Маслова О.В., Лягин И.В., Асланлы А.Г., Сенько О.В., Степанов Н.А., Домнин М.В., Гайдамака С.Н., Агаева М.У., Гайдамака А.О.

Химический факультет Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия
119991, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр.3;
e-mail: elena_efremenko@list.ru

Для включения в состав эффективных препаратов с противогрибковой активностью, позволяющих использовать разные механизмы подавления роста и метаболической активности грибов, в качестве основных претендентов изучаются как металлосодержащие наноматериалы (металлорганические комплексы, наночастицы оксидов металлов, металлоорганические нанозимы), так и различные гидролитические ферменты и оксидоредуктазы. Особый интерес представляют ферменты, гидролизующие молекулы кворумного ответа грибов и амилоидные белки, синтезируемые грибами. Поиск лучших комбинаций осуществляется с использованием компьютерного молекулярного моделирования.

Ключевые слова: противогрибковые препараты, ферменты, наночастицы металлов, гидролазы, молекулы кворума

В связи с развитием резистентности грибных патогенов к ингибирующему воздействию известных антифунгальных агентов в настоящее время остро стоит проблема поиска новых эффективных препаратов с противогрибковой активностью. С этой целью является перспективным проведение рационального комбинирования антимикробных агентов, проявляющих разный механизм воздействия на микроскопические грибы. На мировом рынке доля комбинированных противогрибковых препаратов не превышает 10% от суммы применяемых фунгицидов, при этом большая их часть относится к медицине

Проведенный скрининг среди потенциальных претендентов на включение в состав комбинированных антифунгальных препаратов позволил установить, что при разработке подобных препаратов целесообразным является исследование соединений, которые содержат в своем составе такие металлы, как Ag, Cu, Fe, Zn, Se, Ni, Au, Zr, Ce, Ti и Pd. Наибольшую антигрибковую активность следует ожидать от применения наночастиц (металлорганических комплексов или оксидов металлов), при этом особую роль в предопределении свойств получаемых препаратов могут играть лиганды в составе металл-содержащих соединений. Их преимуществом является обеспечение улучшенной адгезии препаратов к поверхности клеток мицелиальных грибов и дрожжей, возможность повышения их локальной концентрации и облегченное внутриклеточное проникновение. Отдельное внимание привлекают металлсодержащие «нанозимы» - наноматериалы с ферментоподобными характеристиками, в составе которых могут входить Ce, Ag, Fe, Pt, Pd, Cu, Ti. Нанозимы способны имитировать действие пероксидаз, каталаз и супероксиддисмутаз. Представляет интерес включение в состав антифунгальных препаратов нанозимов с гидролазоподобной активностью. Потенциальной мишенью для их воздействия является клеточная стенка грибов (хитин и β-1,3-глюкан).

Помимо нанозимов для включения в состав комплексных препаратов интерес представляют и сами ферменты. Среди них выделяются ферменты, проявляющие гидролитическую активность, направленную на разрушение клеток грибов: хитиназы, протеазы, глюканазы, а также нуклеазы, гидролизующие нуклеиновые кислоты грибов. Применение сразу нескольких нуклеаз в сочетании с глюканазой приводит к тому, что не только прекращается рост клеток грибов, но и наблюдается разрушение мембраны за счет её пермеабилизации и деполимеризации. Оксидоредуктазы, эстеразы и лактоназы, гидролизующие сигнальные молекулы грибов, ответственных за участие в формировании кворумного ответа клеток, и ферменты, способные гидролизовать амилоидные белки, образуемые грибами для адгезии, также являются перспективными претендентами для включения в состав разрабатываемых препаратов.

Методы компьютерного молекулярного моделирования используются для направленного раскрытия наилучших вариантов комбинаций и упрощение поиска возможных сочетаний биомолекул и металлсодержащих наночастиц с антифунгальной активностью.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (проект №23-14-00092).

UDC 615.282 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-110-111

PROSPECTS FOR THE INCLUSION OF METAL-CONTAINING COMPOUNDS AND ENZYMES IN THE COMPOSITION OF ANTIFUNGALS

E.N. Efremenko, O.V. Senko, A.G. Aslanli, N.A. Stepanov, I.V. Lyagin, M.V. Domnin, S.N. Gaydamaka, M.U. Agaeva, A.O. Gaydamaka, O.V. Maslova

Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119991 Moscow, Lenin Hills 1/3, Russia,
e-mail: elena_efremenko@list.ru

To include in the composition of effective drugs with antifungal activity, allowing the use of different mechanisms of suppressing the growth and metabolic activity of fungi, both metal-containing nanomaterials (organometallic complexes, metal oxide nanoparticles, organometallic nanozymes) and various hydrolytic enzymes and oxidoreductases are studied as the main contenders. Of particular interest are enzymes that hydrolyze the molecules of the quorum response of fungi and amyloid proteins synthesized by fungi. The search for the best combinations is carried out using computer molecular modeling.

Key words: antifungals, enzymes, metal nanoparticles, hydrolases, quorum molecules

Due to the development of resistance of fungal pathogens to the inhibitory effects of known antifungal agents, the problem of finding new effective drugs with antifungal activity is currently acute. To this end, it is promising to conduct a rational combination of antimicrobial agents that exhibit a different mechanism of action on microscopic fungi. In the world market, the share of combined antifungal drugs does not exceed 10% of the amount of fungicides used, while most of them relate to medicine

The screening conducted among potential applicants for inclusion in the composition of combined antifungal drugs allowed us to establish that when developing such drugs, it is advisable to study compounds that contain metals such as Ag, Cu, Fe, Zn, Se, Ni, Au, Zr, Ce, Ti and Pd. The greatest antifungal activity should be expected from the use of nanoparticles (organometallic complexes or metal oxides), while ligands in the composition of metal-containing compounds can play a special role in determining the properties of the resulting preparations. Their advantage is to provide improved adhesion of drugs to the cell surface of mycelial fungi and yeast, the possibility of increasing their local concentration and facilitated intracellular penetration. Special attention is drawn to metal-containing "nanozymes" - nanomaterials with enzyme-like characteristics, which may include Ce, Ag, Fe, Pt, Pd, Cu, Ti. Nanozymes are able to simulate the action of peroxidases, catalases and superoxide dismutases. It is of interest to include nanozymes with hydrolase-like activity in the composition of antifungal preparations. A potential target for their effects is the fungal cell wall (chitin and β-1,3-glucan).

In addition to nanozymes for inclusion in the composition of complex preparations, the enzymes themselves are of interest. Among them, there are enzymes that exhibit hydrolytic activity aimed at destroying fungal cells: chitinases, proteases, glucanases, as well as nucleases that hydrolyze the nucleic acids of fungi. The use of several nucleases at once in combination with glucanase leads to the fact that not only the growth of fungal cells stops, but also the destruction of the membrane is observed due to its permeabilization and depolymerization. Oxidoreductases, esterases and lactonases, hydrolyzing signaling molecules of fungi responsible for participating in the formation of the quorum response of cells, and enzymes capable of hydrolyzing amyloid proteins formed by fungi for adhesion, are also promising candidates for inclusion in the composition of the drugs being developed.

Methods of computer molecular modeling are used for the targeted disclosure of the best combinations and simplification of the search for possible combinations of biomolecules and metal-containing nanoparticles with antifungal activity.

Funding: The work was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project №23-14-00092).

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЙ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ: ЗАКОНОМЕРНОСТИ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

BIOLOGICAL TRANSFORMATIONS OF CONTAMINANTS IN THE NATURAL ENVIRONMENT: PATTERNS AND PRACTICAL ASPECTS

1. ПОИСК И ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИПОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ
ДЛЯ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА ПАЛЬМОВОГО МАСЛА
Герасимчук А.Л., Ивасенко Д.А., Трифонов А.А., Топилина Ю.С., Сысоева А.Н., Франк Ю. А. 114

SEARCH AND ISOLATION OF LIPOPHILIC BACTERIA FOR PALM OIL WASTE DISPOSAL
A.L. Gerasimchuk, D.A. Ivasenko, A.A. Trifonov, Y.S. Topilina, A.N. Sysoeva, Y.A. Frank 115

УДК 579.66 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-114-116

ПОИСК И ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИПОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА ПАЛЬМОВОГО МАСЛА

Герасимчук А.Л.[1], Ивасенко Д.А. 1,2, Трифонов А.А.1, Топилина Ю.С.1,2, Сысоева А.Н.2, Франк Ю. А.1,2

[1] Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия
634050, Томск, пр. Ленина, д.36
[2] ООО «Дарвин», Томск, Россия,
634031, Томск, ул. Высоцкого, д. 28 стр.3
e-mail: gerasimchuk_ann@mail.ru

Из отходов очистных сооружений в г. Сурабай (Индонезия) получены изоляты *Pseudomonas weihenstephanensis, P. sesame, P. protegens, Ciceribacter azotifigens* и *Diaphorobacter nitroreducens*, обладающие липолитической активностью. Способность выделенных штаммов к росту с пальмовым маслом в качестве единственного источника углерода позволит использовать их при разработке биотехнологий очистки отходов производства масла.

Ключевые слова: отходы производства пальмового масла, утилизация отходов, микробные биотехнологии, липолитические бактерии

Способность микроорганизмов продуцировать липазы и эстеразы (ферменты, гидролизующие жиры и другие липиды) имеет большой потенциал для использования в биотехнологиях утилизации отходов пищевой промышленности и для очистки жиросодержащих сточных вод. С каждым годом растущее производство пальмового масла (ПМ), расположенное большей частью в Индонезии и Малайзии, приводит к образованию значительных количеств жиросодержащих отходов, которые сливаются в пруды-отстойники и разлагаются там десятилетиями, нанося огромный ущерб окружающей среде. Микроорганизмы-деструкторы различных типов липидов могут быть потенциальными кандидатами для разработки биотехнологий очистки подобных типов отходов.

Целью данного исследования был поиск микроорганизмов – деструкторов пальмового масла для последующей разработки технологии утилизации отходов его производства. Источником для выделения микроорганизмов явились пробы жидких отходов из очистных сооружений г. Сурабая в Индонезии. Исследованы некоторые физико-химические параметры отходов, послуживших источниками для культивирования микроорганизмов: значение pH составило 6.9, ХПК – 92.7 мгО/л, содержание ионов аммония – 31.6 мг/л, нитрат-иона – 134 мг/л, нитрит-иона – 30 мг/л, сульфатов – 263 мг/л, хлоридов – 214 мг/л, фосфора фосфатов – 4.16 мг/л. Жидкие отходы использовали в качестве инокулята при проведении посева методом разведений на агаризованную синтетическую среду с добавлением ПМ и карбоксиметилцеллюлозы в конечной концентрации 1 % и на богатую питательную среду Plate Count Agar (PCA). Все полученные чистые культуры тестировали на способность к росту и образованию зон гидролиза на плотной диагностической среде с 1 % трибутирином. Филогенетическую принадлежность штаммов определяли на основе анализа последовательностей гена 16S рРНК. Выделение ДНК из бактериальных культур проводили с помощью коммерческого набора DU от Biolabmix (Новосибирск, Россия). Далее полученные препараты ДНК использовали для проведения ПЦР-амплификации бактериальных генов 16S рРНК с праймерами 27F и 1492R. Состав ПЦР-смеси и режим амплификации описаны ранее (Герасимчук и др., 2022).

Всего получено 18 изолятов, 15 из которых показали наличие липолитический активности на диагностической среде с наличием зон гидролиза, что свидетельствует о продукции внеклеточных липаз/эстераз. Все проанализированные фрагменты ДНК длиной 1034-1439 п.о. показали высокий процент сходства (99.5-100 %) с типовыми штаммами микроорганизмов из базы данных GeneBank NCBI. Большинство полученных штаммов оказались представителями псевдомонад, относящихся к классу Gammaproteobacteria, а именно *Pseudomonas weihenstephanensis, P. sesame* и *P. protegens*. Два штамма представляют бактерий, связанных с циклом азота, а именно азотфиксатора *Ciceribacter azotifigens* (класс Alphaproteobacteria) и денитрификатора *Diaphorobacter nitroreducens* (Betaproteobacteria). Три штамма, отнесенные к *Bacillus cereus* (класс Bacilli), а также штамм *Mycolicibacterium vaccae* (класс Actinomycetes) оказались родственны условно патогенным микроорганизмам, относящимся к группе риска II в соответствии с классификацией ВОЗ и были исключены из дальнейшей работы.

На основе полученных результатов по филогенетическому анализу, определению липолитической активности и способности к росту на среде с пальмовым маслом штаммы *Pseudomonas, Ciceribacter* и *Diaphorobacter* являются перспективными для создания консорциума и разработки биотехнологии очистки отходов производства пальмового масла.

Исследование выполнено при поддержке проекта № 5.2.5.23 Передовой инженерной школы «Агробиотек» Томского государственного университета.

UDC 579.66 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-114-116

SEARCH AND ISOLATION OF LIPOPHILIC BACTERIA FOR PALM OIL WASTE DISPOSAL

Gerasimchuk A.L.[1], Ivasenko D.A.[1,2], Trifonov A.A.[1], Topilina Y.S.[1,2], Sysoeva A.N.[2], Frank Y.A.[1]

[1] National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation
634050, Tomsk, Lenin Ave, 36
[2] Darwin LLC, Tomsk, Russia
634031, Tomsk, Vysotskogo Str., 28 build.3
e-mail: gerasimchuk_ann@mail.ru

Bacterial isolates of *Pseudomonas weihenstephanensis, P. sesame, P. protegens, Ciceribacter azotifigens* and *Diaphorobacter nitroreducens* demonstrating lipolytic activity were obtained from the wastes of a treatment plant in Surabai (Indonesia). The ability of isolated bacteria to grow using palm oil as a sole carbon source make them promising candidates for development of biotechnologies for palm oil waste disposal.

Key words: palm oil wastes, waste disposal, microbial biotechnologies, lipolytic bacteria

The ability of microorganisms to produce lipases and esterases (enzymes catalyzing hydrolysis of fats and other lipids) has great potential for use in biotechnologies for the disposal of food industry waste and for the treatment of fat-containing wastewater. Every year, the growing production of palm oil (PO), located mainly in Indonesia and Malaysia, leads to the formation of significant amounts of oil-containing wastes, which are discharged into settling ponds and decompose there for decades, causing enormous damage to the environment. Microorganisms which are able to degrade various types of lipids may be potential candidates for the development of biotechnologies for the treatment and disposal of such types of waste.

The purpose of this study was to search for microorganisms capable to degrade PO for the subsequent development of a biotechnology. Samples of liquid wastes collected from a treatment plant in Surabaya (Indonesia) were used as a source for cultures. Some physic-chemical parameters of the wastes were studied such as the pH value (6.90 pH units), COD (92.7 mgO/L), the content of ammonium ions (31.6 mg/L), nitrates (134 mg/L), nitrites (30 mg/L), sulfates (263 mg/L), chlorides (214 mg/L), and phosphates (4.16 mg/L). Liquid waste was used as an inoculum for series of dilutions with the following cultivation in agar synthetic medium with the addition of raw PO and carboxymethyl cellulose at a final concentration of 1% and on a rich nutrient medium Plate Count Agar (PCA). All isolates were tested for the ability to grow and form zones of hydrolysis on a dense diagnostic medium with tributyrin (1 %). The phylogenetic affiliation of the strains was determined based on the 16S rRNA gene sequence analysis. DNA isolation from bacterial cultures was performed using a commercial DU kit from Biolabmix (Novosibirsk, Russia). Further, the DNA preparations were used for PCR amplification of bacterial 16S rRNA gene with 27F and 1492R nucleotide primers. The composition of the PCR mixture and the amplification mode were described earlier (Gerasimchuk et al., 2022).

A total of 18 isolates were obtained, 15 of which showed the lipolytic activity in the diagnostic medium with the formation of hydrolysis zones, which indicates the production of extracellular lipases/esterases. All analyzed DNA fragments (1034-1439 bp) showed a high percentage of similarity (99.5 to 100%) with the type strains of microorganisms from the GeneBank NCBI database. Most of the obtained strains were representatives of pseudomonads belonging to the class Gammaproteobacteria – *Pseudomonas weihenstephanensis, P. sesame* and *P. protegens*. Two strains represent microorganisms involved in the nitrogen cycle, namely the nitrogen fixer *Ciceribacter azotifigens* (Alphaproteobacteria) and the denitrifying bacteria *Diaphorobacter nitroreducens* (Betaproteobacteria). Three strains assigned to *Bacillus cereus* (Bacilli) and a strain of *Mycolicibacterium vaccae* (Actinomycetes) were related to opportunistic pathogens belonging to risk group II according to the WHO classification and were excluded from further studies.

Based on the results of phylogenetic analysis, assessment of lipolytic activity and ability to grow in a medium with PO, isolated strains of *Pseudomonas, Ciceribacter* and *Diaphorobacter* are promising for using in an industrial consortium and the development of biotechnology for palm oil waste disposal.

The study was conducted within the Project No. 5.2.5.23 of the Advanced Engineering School "Agrobiotek" of Tomsk State University.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ И КОРМОВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

GENETIC RESOURCES AND BIOTECHNOLOGY PROCESSES IN FOOD AND FEED INDUSTRY

1. ПОВЫШЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ ЗЕЛЕНОЙ МАССЫ АМАРАНТА ПРИ ПОЛУЧЕНИИ БЕЛКОВО-ВИТАМИННОГО КОНЦЕНТРАТА
Образцова С.В., Бондарева О.В., Свиридова Т.В., Шуваева Г.П., Мирошниченко Л.А., Корнеева О.С. 119

THE INCREASE OF CARBOHYDRATE NUTRITIONAL VALUE OF GREEN MASS OF AMARANTH IN OBTAINING HIGH-PROTEIN SILAGE
S.V. Obraztsova, O.V. Bondareva, T.V. Sviridova, G.P. Shuvaeva, L.A. Miroshnichenko, O.S. Korneeva 120

2. ПОЛУЧЕНИЕ ЛАКТАЗ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА ЛАКТУЛОЗЫ
Рябцева С.А., Храмцов А.Г., Шпак М.А., Лодыгин А.Д., Сазанова С.Н. 120

PRODUCTION OF LACTASES FOR LACTULOSE BIOSYNTHESIS
S.A. Ryabtseva, A.G. Khramtsov, M.A. Shpack, A.D. Lodygin, S.N. Sazanova 122

3. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГРЕЧИХИ В ПРОИЗВОДСТВЕ ОРИГИНАЛЬНЫХ СПИРТНЫХ НАПИТКОВ
Серба Е.М., Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Крючкова Е.Р., Крыщенко Ф.И., Медриш М.Э. 123

BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF THE USE OF BUCKWHEAT IN THE PRODUCTION OF ORIGINAL ALCOHOLIC BEVERAGES
E.M. Serba, L.V. Rimareva, M.B. Overchenko, N.I. Ignatova, E.R. Kryuchkova, F.I. Kryshchenko, M.E. Medrish 124

4. БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ГРАНАТА
Зияева С.Ф., Васина С.М., Тагирова М.А. 125

BIOCHEMICAL ASPECTS OF COMPLEX PROCESSING OF POMEGRANATE
S.F. Ziyaeva, S.M. Vasina, M.A. Tagirova 126

5. БИОМАССА НАСЕКОМЫХ И ЕЕ ПЕРЕРАБОТКА ДЛЯ ПИЩЕВЫХ ИЛИ КОРМОВЫХ ЦЕЛЕЙ
Ушакова Н.А., Бастраков А.И. 128

INSECT BIOMASS AND ITS PROCESSING FOR FOOD OR FORAGE PURPOSES
N.A. Ushakova, A.I. Bastrakov 129

УДК 606:631:577 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-119-120

ПОВЫШЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ ЗЕЛЕНОЙ МАССЫ АМАРАНТА ПРИ ПОЛУЧЕНИИ БЕЛКОВО-ВИТАМИННОГО КОНЦЕНТРАТА

Образцова С.В.[1], Бондарева О.В.[1], Свиридова Т.В.[1], Шуваева Г.П.[1], Мирошниченко Л.А.[2], Корнеева О.С.[1]

[2] Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия 394036, Россия, Воронеж, проспект Революции, д. 19
[2] ООО «Русская олива», Воронеж, Россия
e-mail: sveta5501pavlenkova@yandex.ru

Установлено, что применение мультиэнзимного комплекса в процессе предварительной обработки зеленой массы амаранта способствует снижению антипитательных веществ в белково-витаминном концентрате.

Ключевые слова: зеленая масса амаранта; антипитательные вещества; белково-витаминный концентрат; мультиэнзимный комплекс

В условиях нестабильной политической ситуации, наложения санкционных мер на экономику России и высокую импортозависимость сырьевой базы в кормопроизводстве разработка эффективных отечественных кормовых добавок, способствующих улучшению переваримости кормов, увеличению мясной и яичной продуктивности перепелов, а также повышению биологической ценности мяса является актуальной задачей. В настоящее время намечается тенденция замены в рационе питания кормовых добавок, полученных химическим синтезом. Ведутся активные поиски нового высокопродуктивного сырья для получения кормовых добавок с применением биологических методов. [1,2]

Одной из перспективных кормовых культур является амарант, имеющий уникальный химический состав. В зеленой массе амаранта в пересчете на абсолютно сухой вес содержится, %: сырого протеина 15,6-16,75 (в листьях до 30), жира - 2,4-2,8, клетчатки - 16,0-21,7, кальция 2,1-2,6, фосфора 0,2-0,21, каротина 160-200 мг [3]. Однако совместно с полезными питательными веществами в фитомассе амаранта накапливаются антипитательные вещества, способствующие не только ухудшению усвояемости кормов, но и приводящие к серьезным нарушениям обмена веществ организма. В связи с этим, целью нашей работы являлось определение содержания антипитательных веществ в зеленой массе амаранта и разработка способа повышения ее биологической ценности с использованием мультиэнзимного комплекса.

Объектами исследования являлись измельченная зеленая масса амаранта и мультиэнзимный комплекс, представляющий собой смесь фитазы, ксиланазы, протеазы, бета-глюканазы, танназы, оксалатоксидазы и целлюлазы. Установлено, что предварительная ферментативная обработка фитомассы амаранта в течение 48 ч обеспечивает максимальное снижение фитиновой кислоты, танинов, нитратов, щавелевой на 29, 18, 50 и 32 % соответственно. Кроме того, внесение мультиэнзимного комплекса способствует повышению биологической ценности зеленой массы амаранта за счет повышения уровня использования аминокислот и некрахмалистых полисахаридов.

Исследования выполнены при поддержке Российского научного фонда 22-76-00062.

Литература:

1. *Нормова, Т.А. Долгосрочные перспективы развития птицеводства в России / Т.А. Нормова, Р.В. Схабо, П.В. Шимко// Вестник Академии знаний, 2020 - №38 (3). – С.218-239*
2. *Липовая Е. А. Белково-витаминноминеральный концентрат в кормлении сельскохозяйственной птицы / Е.А. Липова // Сборник научных трудов ставропольского научно исследовательского института животноводства и кормопроизводства. – 2014 – Т.2 № 7 – С. 153-156.*
3. *Pavlenkova S.V., Shuvaeva G.P., Mesheryakova O.L., Miroshnichenko L.A., Korneeva O.S. Amaranth – A primising crop for fodder manufacturing// Jornal of biotechnology. – 2017. – P.27.*

UDC 606:631:577 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-119-120

THE INCREASE OF CARBOHYDRATE NUTRITIONAL VALUE OF GREEN MASS OF AMARANTH IN OBTAINING HIGH-PROTEIN SILAGE

S.V. Obraztsova[1], O.V. Bondareva[1], T.V. Sviridova[1], G.P. Shuvaeva[1], L.A. Miroshnichenko[2], O.S. Korneeva[1]

[1] Voronezh state university of engineering technologies, Voronezh, Russia 394036, Russia, Voronezh, Revolutsii av., 19
[2] OOO «Russkaya Oliva», Voronezh, Russia
e-mail: sveta5501pavlenkova@yandex.ru

It has been established that the use of a multienzyme complex in the process of pretreatment of amaranth green mass contributes to the reduction of anti-nutritional substances in protein-vitamin concentrate.

Key words: green mass of amaranth; anti-nutritional substances; protein and vitamin concentrate; multienzyme complex

In an unstable political situation, the imposition of sanctions on the Russian economy and the high import dependence of the raw material base in feed production, the development of effective domestic feed additives that improve the digestibility of feed, increase the meat and egg productivity of quails, as well as increase the biological value of meat is an urgent task. Currently, there is a tendency to replace feed additives obtained by chemical synthesis in the diet. An active search is underway for new highly productive raw materials for the production of feed additives using biological methods. [1,2]

One of the promising fodder crops is amaranth, which has a unique chemical composition. The green mass of amaranth in terms of absolutely dry weight contains, %: crude protein 15.6-16.75 (in leaves up to 30), fat - 2.4-2.8, fiber - 16.0-21.7, calcium 2.1-2.6, phosphorus 0.2-0.21, carotene 160-200 mg [3]. However, together with useful nutrients, anti-nutritional substances accumulate in the amaranth phytomass, contributing not only to the deterioration of the digestibility of feed, but also leading to serious metabolic disorders of the body. In this regard, the purpose of our work was to determine the content of anti-nutritional substances in the green mass of amaranth and to develop a way to increase its biological value using a multienzyme complex.

The objects of the study were the crushed green mass of amaranth and a multienzyme complex, which is a mixture of phytase, xylanase, protease, beta-glucanase, tannase, oxalate oxidase and cellulase. It was found that the preliminary enzymatic treatment of amaranth phytomass for 48 hours provides a maximum reduction of phytic acid, tannins, nitrates, oxalic acid by 29, 18, 50 and 32%, respectively. In addition, the introduction of a multienzyme complex helps to increase the biological value of the green mass of amaranth by increasing the level of use of amino acids and non-starchy polysaccharides.

The research was carried out with the support of the Russian Science Foundation 22-76-00062

References:

1. *Normova T.A., Shabo R.V., Shimko P.V. Long-term prospects for the development of poultry farming in Russia // Bulletin of the Academy of Knowledge. – 2020. – №38 (3). - P. 218-239.*
2. *Lipova E.A. Protein-vitamin-mineral concentrate in poultry feeding // Collection of scientific papers of the Stavropol Scientific Research Institute of Animal Husbandry and feed Production. – 2011. – P. 20-26.*
3. *Pavlenkova S.V., Shuvaeva G.P., Mesheryakova O.L., Miroshnichenko L.A., Korneeva O.S. Amaranth – A primising crop for fodder manufacturing // Jornal of biotechnology. – 2017. – P.27.*

УДК 637.345.03:663.15 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-120-122

ПОЛУЧЕНИЕ ЛАКТАЗ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА ЛАКТУЛОЗЫ

Рябцева С.А., Храмцов А.Г., Шпак М.А., Лодыгин А.Д., Сазанова С.Н.

ФГАОУ ВО Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия 355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, 1
e-mail: ryabtseva07@mail.ru

Для получения лактулозы могут быть использованы лактазы, хорошо изученные и безопасные ферменты. Исследованы особенности роста и инактивации различных видов их продуцентов, молочнокислых бактерий и дрожжей в молочной сыворотке и ее пермеате, полученном методом ультрафильтрации. Определены оптимальные параметры процессов для получения лактаз.

Ключевые слова: лактазы, дрожжи, молочнокислые бактерии, молочная сыворотка, пермеат

Лактулоза считается пребиотиком №1, так как относится к наиболее изученным бифидогенным факторам с доказанным положительным влиянием на функционирование кишечника, печени и других органов человека. Благодаря этому лактулозу не только давно применяют в медицине, но и добавляют в различные пищевые продукты [1].

Ферментативный синтез лактулозы имеет определенные преимущества по сравнению с традиционными способами ее получения путем щелочной изомеризации лактозы, в т.ч. возможность проведения реакции в более мягких условиях и использования вторичного молочного сырья. В биотехнологии лактулозы применяют β-галактозидазы (лактазы) или целлюлозо-2-эпимеразы, причем лактазы являются более изученными и безопасными ферментами, которые выпускают промышленно в значительных объемах [2].

Исследованы особенности культивирования различных видов молочнокислых бактерий в молочной сыворотке и ее пермеате, полученном методом ультрафильтрации (УФ-пермеате) для получения лактаз. Подсырная сыворотка является более благоприятной средой для их роста, чем УФ-пермеаты. Для ускорения роста молочнокислых бактерий в пермеате предложено использовать добавление 2% пептона. Оптимальная продолжительность культивирования молочнокислых микроорганизмов в сыворотке и пермеате составляет 24 ч. Наиболее перспективными продуцентами бета-галактозидазы являются *Lactobacillus acidophilus* и *Streptococcus thermophilus* [3].

Исследованы закономерности роста и инактивации лактозосбраживающих дрожжей в подсырной сыворотке и УФ-пермеате при отдельном и совместном с молочнокислыми бактериями культивировании как основы получения лактаз. *Kluyveromyces marxianus* больше зависели от источников азота и накапливали во вторичном молочном сырье биомассу медленнее, чем *Candida kefyr*. В ходе экспериментов не выявлено существенного влияния солей калия и магния на накопление биомассы *K. marxianus*. При совместном культивировании дрожжей и молочнокислых бактерий добавление *S. thermophilus* стимулировало рост *K. marxianus*, а *L. lactis ssp.* – подавляло его через 24 часа инкубации. *L. acidophilus* не оказали значимого влияния на развитие *K. marxianus* через 24 часа инкубации. Нагревание до 50 °С в течение 24 часов приводит к полной инактивации исследованных дрожжей. Исследована активность полученных ферментов, проведен биосинтез лактулозы с их использованием.

Работа выполняется при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства по теме: «Создание первого в России высокотехнологичного производства пребиотика лактулозы и функциональных молочных ингредиентов для импортозамещения в медицине, ветеринарии, детском питании, производстве лечебно-профилактических продуктов для людей и животных» (Соглашение №075-11-2022-021 от 07.04.2022).

Литература

1. *Рябцева С.А., Храмцов А.Г., Будкевич Р.О. и др. Физиологические эффекты, механизмы действия и применение лактулозы / С.А. Рябцева, А.Г. Храмцов, Р.О. Будкевич, Г.С. Анисимов, А.О. Чукло, М.А. Шпак // Вопросы питания. – 2020. – Т. 89, № 2. – С. 6 - 21. doi: 10.24411/0042-8833-2020-10012.*
2. *Рябцева С.А., Храмцов А.Г., Шпак М.А. и др. Биотехнология лактулозы: современные достижения, проблемы и перспективы / С.А. Рябцева, А.Г. Храмцов, М.А. Шпак, А.Д. Лодыгин, Г.С. Анисимов, С.Н. Сазанова, Ю.А. Табакова // Техника и технология пищевых производств. – 2023. – Т. 53. – № 1. – С. 97–122. (На англ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2419.*
3. *Шпак М.А., Рябцева С.А., Лодыгин А.Д. и др. Исследование особенностей культивирования молочнокислых бактерий в подсырной сыворотке и УФ-пермеате для получения β-галактозидаз / М.А. Шпак, С.А. Рябцева, А.Д. Лодыгин, А.А. Семченко // Современная наука и инновации. – 2023. – № 2 (42). – С.126-136.*

UDC 637.345.03:663.15 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-120-122

PRODUCTION OF LACTASES FOR LACTULOSE BIOSYNTHESIS

S.A. Ryabtseva, A.G. Khramtsov, M.A. Shpack, A.D. Lodygin, S.N. Sazanova

FSAEI HE "North-Caucasus Federal University", Stavropol, Russia
355009, Stavropol, Pushkin st., 1
e-mail: ryabtseva07@mail.ru

Lactases, well-studied and safe enzymes, can be used to obtain lactulose. The features of growth and inactivation of various types of lactic acid bacteria and yeasts in whey and permeate obtained by ultrafiltration have been studied. The optimal parameters of the processes for lactases obtaining have been determined.

Keywords: lactase, yeast, lactic acid bacteria, whey, permeate

Lactulose is considered the No. 1 prebiotic, as it belongs to the most studied bifidogenic factors with a proven positive effect on the functioning of the intestines, liver and other human organs. Thanks to this, lactulose has not only been used in medicine for a long time, but also added to various foods [1].

The enzymatic synthesis of lactulose has certain advantages over traditional methods for its production by alkaline isomerization of lactose, including the possibility of carrying out the reaction under milder conditions and the use of secondary dairy raw materials. In the biotechnology of lactulose, β-galactosidases (lactases) or cellulose-2-epimerases are used, and lactases are more studied and safe enzymes that are industrially produced in significant volumes [2].

The features of cultivation of various types of lactic acid bacteria in milk whey and in whey permeate obtained by ultrafiltration (UF permeate) to obtain lactases have been studied. Cheese whey is a more favorable medium for their growth than UF permeates. To accelerate the growth of lactic acid bacteria in the permeate, it is proposed to use the addition of 2% peptone. The optimal duration of cultivation of lactic acid microorganisms in whey and permeate is 24 hours. The most promising producers of beta-galactosidase are *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophilus* [3].

The patterns of growth and inactivation of lactose-fermenting yeasts in cheese whey and UF permeate were studied during separate and joint cultivation with lactic acid bacteria as the basis for obtaining lactases. *Kluyveromyces marxianus* is more dependent on nitrogen sources and accumulates biomass in secondary raw materials more slowly than *Candida kefyr*. During the experiments, no significant effect of potassium and magnesium salts on the accumulation of *K. marxianus* biomass was revealed. In the co-cultivation of yeast and lactic acid bacteria, the addition of *S. thermophilus* stimulated the growth of *K. marxianus*, but *L. lactis ssp.* is suppressed it after 24 hours of incubation. *L. acidophilus* had no significant effect on the development of *K. marxianus* after 24 hours of incubation. Heating to 50 °C during 24 hours resulted in complete inactivation of the tested yeasts. The activity of the obtained enzymes was studied, the biosynthesis of lactulose using them was carried out.

The work is carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of the implementation of a comprehensive project to create a high-tech production on the topic: "Creation of the first high-tech production in Russia of lactulose prebiotic and functional dairy ingredients for import substitution in medicine, veterinary medicine, baby food, production of medical preventive products for humans and animals" (Agreement No. 075-11-2022-021 of 04/07/2022).

References

1. *Ryabtseva S.A., Khramtsov A.G., Budkevich R.O. Physiological effects, mechanisms of action and application of lactulose / S.A. Ryabtseva, A.G. Khramtsov, R.O. Budkevich, G.S. Anisimov, A.O. Chuklo, M.A. Shpak // Problems of Nutrition. - 2020. - V. 89, No. 2. - P. 6 - 21. doi: 10.24411 / 0042-8833-2020-10012.*
2. *Biotechnology of lactulose production: progress, challenges, and prospects / Ryabtseva S.A., Khramtsov A.G., Shpak M.A., Lodygin A.D., Anisimov G.S., Sazanova S.N., Tabakova Yu.A.// Food Processing: Techniques and Technology. 2023. T. 53. № 1. C. 97-122. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2419*
3. *Shpak M.A., Ryabtseva S.A., Lodygin A.D. et al. Investigation of the cultivation of lactic acid bacteria in cheese whey and UV permeate to obtain β-galactosidases / M.A. Shpak, S.A. Ryabtseva, A.D. Lodygin, A.A. Semchenko // Modern science and innovations. - 2023. - No. 2 (42). - P.126-136.*

УДК 663.53 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-123-125

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГРЕЧИХИ В ПРОИЗВОДСТВЕ ОРИГИНАЛЬНЫХ СПИРТНЫХ НАПИТКОВ

Серба Е.М., Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Крючкова Е. Р., Крыщенко Ф.И., Медриш М.Э.

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

Подобраны комплекс ферментов, раса дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и условия ферментации, обеспечивающие улучшение технологических показателей гречишного сусла. Выявлено, что в процессе ферментации гречихи снижался уровень синтеза вторичных метаболитов и изменялось их количественное содержание в составе летучих примесей по сравнению с традиционно используемыми зерновыми культурами в производстве спиртных дистиллятов.

Ключевые слова: гречиха, ферментные препараты, ферментация, дрожжи, этанол, летучие метаболиты, зерновые дистилляты

В последнее время проводятся активные исследования, направленные на расширение сырьевой базы для производства отечественных конкурентоспособных спиртных напитков, обладающих оригинальными органолептическими свойствами [1, 2]. Перспективным сырьем для получения новых зерновых дистиллятов является гречиха, в состав которой помимо крахмала, белка и полисахаридов входят ароматические и биологически активные вещества, необходимые для жизнедеятельности дрожжей и способствующие образованию летучих ароматобразующих соединений в результате различных биохимических превращений компонентов растительного сырья в процессе его биокаталической конверсии, сбраживания и дистилляции [3].

Цель данных исследований состояла в изучении влияния особенностей состава полимеров в зерне гречихи на качество сусла, эффективность его сбраживания и синтез метаболитов для обоснования возможности использования гречихи в технологиях зерновых дистиллятов.

Полученные актуальные данные о составе основных полимеров зерна гречихи позволили подобрать ферментные препараты с различной субстратной специфичностью и уровнем активности и выявить необходимость повышения дозировки ксиланаз и β-глюканаз из-за высокого содержания некрахмальных полисахаридов в зерне гречихи по сравнению зерновыми культурами (пшеница, рожь, кукуруза) традиционно применяемыми в производстве зерновых дистиллятов.

Подобраны условия ферментации (состав и дозировки ферментов, концентрация гречишного сусла и раса спиртовых дрожжей), обеспечивающие снижение вязкости сусла в 2,3 раза, повышение концентрации растворимых углеводов на 15,3 % и аминного азота на 9,0 %, увеличение выхода целевого продукта – этилового спирта и сокращение уровня синтеза побочных продуктов брожения.

Выявлено, что использование гречихи в технологии зерновых дистиллятов по сравнению с традиционными зерновыми культурами приводило к изменению количественного содержания вторичных метаболитов в составе летучих примесей (рис.).

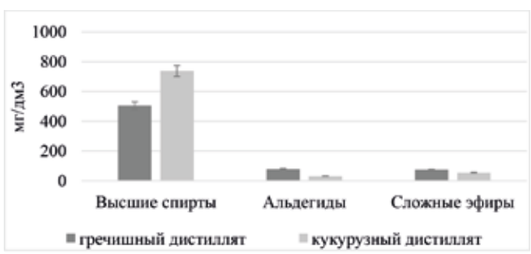

Рисунок - Содержание побочных метаболитов в гречишном и кукурузном дистиллятах

Установлено, что при этом в 1,4 раза снижалась доля высших спиртов и повышалась доля альдегидов и эфиров, которые могут оказывать влияние на появление оригинальных оттенков и тонов в аромате и вкусе дистиллятов; особенно увеличивалось содержание ацетальдегида - в 2 раза и этилацетата - в 1,35 раза.

Работа проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания (тема № FGMF-2022-0006).

Литература

1. *Абрамова И.М., Медриш М.Э., Савельева В.Б., Романова А.Г., Гаврилова Д.А. Исследование летучих примесей в спиртных напитках, изготовленных из выдержанных зерновых дистиллятов //Пищевая промышленность. – 2018. - № 7. – С.71-76.*

2. *Агафонов Г.В., Чусова А.Е., Ковальчук Н.С., Зуева Н.В. Возможность применение гречихи в технологии ферментированного солода // Вестник ВГУИТ. 2018. Т. 80. № 4. С. 170–176. doi:10.20914/2310- 1202-2018-4-170-176*

3. *Серба Е.М., Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Микуляк А.А., Иванов В.В. Обоснование перспективы использования гречихи в производстве оригинальных спиртных напитков // Пищевая промышленность. – 2023. - № 5 С. 45-47.*

UDC 663.53 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-123-125

BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF THE USE OF BUCKWHEAT IN THE PRODUCTION OF ORIGINAL ALCOHOLIC BEVERAGES

E.M. Serba, L.V. Rimareva, M.B. Overchenko, N.I. Ignatova, E.R. Kryuchkova, F.I. Kryshchenko, M.E. Medrish

Russian Research Institute of Food Biotechnology - Branch of the Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety.
Moscow, the Russian Federation. 4B, Samokatnaya str., 111033,
serbae@mail.ru

A complex of enzymes, a race of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and fermentation conditions were selected to improve the technological performance of buckwheat must. It was revealed that in the process of buckwheat fermentation, the level of synthesis of secondary metabolites decreased and their quantitative content in the composition of volatile impurities changed in comparison with traditionally used crops in the production of alcoholic distillates.

Keywords: buckwheat, enzyme preparations, fermentation, yeast, ethanol, volatile metabolites, grain distillates

Recently, active research has been conducted aimed at expanding the raw material base for the production of domestic competitive alcoholic beverages with original organoleptic properties [1, 2]. A promising raw material for the production of new grain distillates is buckwheat, which, in addition to starch, protein and polysaccharides, includes aromatic and biologically active substances necessary for the vital activity of yeast and contributing to the formation of volatile aroma-forming compounds as a result of various biochemical transformations of plant raw materials components during its biocatalytic conversion, fermentation and distillation [3].

The purpose of these studies was to study the influence of the composition of polymers in buckwheat grain on the quality of wort, the efficiency of its fermentation and synthesis of metabolites to substantiate the possibility of using buckwheat in grain distillate technologies.

The obtained up-to-date data on the composition of the main polymers of buckwheat grain made it possible to select enzyme preparations with different substrate specificity and activity level and to identify the need to increase the dosage of xylanases and β-glucanases due to the high content of non-starch polysaccharides in buckwheat grain compared to grain crops (wheat, rye, corn) traditionally used in the production of grain distillates.

Fermentation conditions were selected (composition and dosage of enzymes, concentration of buckwheat wort and race of alcoholic yeast), providing a 2.3–fold decrease in wort viscosity, an increase in the concentration of soluble carbohydrates by 15.3% and amine nitrogen by 9.0%, an increase in the yield of the target product - ethyl alcohol and a reduction in the level of synthesis of fermentation by-products.

It was revealed that the use of buckwheat in the technology of grain distillates in comparison with traditional grain crops led to a change in the quantitative content of secondary metabolites in the composition of volatile impurities (Fig.).

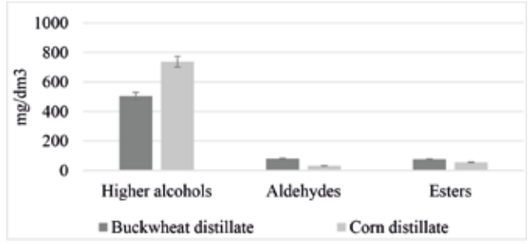

Figure - The content of side metabolites in buckwheat and corn distillates

It was found that in this case, the proportion of higher alcohols decreased by 1.4 times and the proportion of aldehydes and esters increased, which can affect the appearance of original shades and tones in the aroma and taste of distillates; especially increased the content of acetaldehyde - 2 times and ethyl acetate - 1.35 times.

The work was carried out at the expense of subsidies for the implementation of the state task (topic No. FGMF-2022-0006).

References

1. *Abramova I.M., Medrish M.E., Savelyeva V.B., Romanova A.G., Gavrilova D.A. Study of volatile impurities in alcoholic beverages made from aged grain distillates // Food industry. - 2018. - No. 7. - P.71-76.*

2. *Agafonov G.V., Chusova A.E., Kovalchuk N.S., Zueva N.V. The possibility of using buckwheat in the technology of fermented malt // Vestnik VSUIT. 2018. V. 80. No. 4. S. 170–176. doi:10.20914/2310-1202-2018-4-170-176*

3. *Serba E.M., Rimareva L.V., Overchenko M.B., Ignatova N.I., Mikulyak A.A., Ivanov V.V. Substantiation of the prospects for the use of buckwheat in the production of original alcoholic beverages // Food industry. - 2023. - No. 5 S. 45-47.*

УДК 664.7.014.019 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-125-127

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ГРАНАТА

Зияева С.Ф., Васина С.М., Тагирова М.А.

Химический факультет Самаркандского государственного университета имени Ш.Рашидова, кафедра физической и коллоидной химии, Самарканд, 140104, Университетский бульвар,15, Узбекистан
e-mail: mashxurat@mail.ru

Изучена возможность комплексной переработки плодов граната местных сортов. На основании экспериментальных данных по ферментативной активности амилазы и пектиназы предложены оптимальные условия процесса депектизации при производстве концентрата осветленного гранатового сока. Исследованы факторы, влияющие на экстракцию антиоксидантов из кожуры граната.

Ключевые слова: гранат, эстракция, антиаксиданты.

Ограниченность сырьевых ресурсов и экологически вредные для человека изменения в природе ставят вопрос о разработке научно - обоснованной комплексной и экологически безопасной технологии переработки вторичного сырья и необходимости создания производства нового поколения пищевых продуктов, сбалансированных по главным составляющим компонентам: белкам, углеводам, жирам, ферментам и другим биологически активным веществам [1]. Эти обстоятельства требуют внимательного рассмотрения вопросов по изучению биотехнологии плодово-ягодного сырья и их отходов при использовании пектолитических и амилолетических ферментов в пищевой промышленности, в частности, консервной и соковой промышленности [2].

В рациональном пищевом балансе питания человека важное место занимают гранаты. Физико-химические свойства продуктов переработки плодов граната вариабельные и зависят от места произрастания исходного сырья и способов его переработки. Результаты исследований по изучению этих свойств служат

основой для организации комплексной производства граната. На основе полученных научных данных возможно усовершенствование технологической схемы производства гранатового экстракта и внедрении обоснованной схемы комплексной безотходной переработки граната. По этой причине исследовательские работы, направленные на разработку научных основ комплексной переработки плодов граната, являются актуальной проблемой, позволяющей получать продукты переработки гранатов с натуральными компонентами улучшенного качества.

Объектами исследования являлись плоды сортов гранатов, произрастающих на территории Узбекистана, технический сок и жом. При производстве гранатового сока отходы составляют до 50% от массы поступающих на переработку плодов в виде кожуры и семян.

На всех линиях осуществляются одни и те же операции при получении гранатного сока и его концентрата. Однако особенности технологии до сих пор не позволили получать концентрат, сохранивший натуральный цвет, без мутности, создаваемой следами собственных протеинов и приобретенных при обработке желатином. Содержание пектина в сортах граната, произрастающих на территории Узбекистана незначительно, а в некоторых отсутствует. Однако учитывая, что при производстве сока в качестве сырья используют несколько сортов гранат проведено тестирование мезги на содержание пектиновых веществ с помощью спирта и крахмала - по йодной пробе. Полученные результаты показали, что процесс ферментации на стадии обработки мезги можно не проводить, а следовательно выход сока не будет зависеть от введения ферментов. При получении осветленного сока проведение депектинизации необходимо. В связи с вышеизложенным, изучена активность ферментов при производстве осветленного гранатового сока. На стадии депектизации используются Amylase AG XXL и Pectinex Ultra Color. Перед применением провели апробацию ферментов. Белковая природа обеспечивает ферментам характерные для белков способность изменять активность в зависимости от различных факторов. Изучено влияние температуры и pH на скорость ферментативных реакций применяемых ферментов. На основании полученных данных установлено, что оптимальным значением температуры, при которой реакция протекает с максимальной скоростью, в интервале 37-50 ºС Оптимальным является значение pH 5,33, при котором реакция протекает с максимальной скоростью. Показано, что после энзиматической переработки сока, фермент, остающийся на активированном угле, сохраняет свою 30-40 % энзиматическую активность при этом по сравнению с исходным.

Таким образом, изучен процесс экстракции антиоксидантов из кожуры граната. Определены оптимальные условия выделения растворимых фенольных соединений экстракцией водой как наиболее экономичным, безопасным и экологически чистым растворителем. Установлено, что суммарное количественное содержание фенольных соединение составило 84,67 мг/г при антиоксидантной активности 18%.

Литература

1. Голубев В.Н., Жиганов И.Н. Пищевая биотехнология.– М.Делипринт, 2001 – 423с.

2. Иванова А.А., Войно Л.И., ИС.Иванова. Пищевая биотехнология. М. Колос С, 2008 - 427с.

3. Гафизов Г. К. Изучение вопросов комплексной переработки плодов граната//Proceedings of the International Scientific and Practical Conference «Methodology of modern research». Dubai, UAE: Rost Publishing, 2015. – vol. 1, – P. 15–27.

UDC 664.7.014.019 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-125-127

BIOCHEMICAL ASPECTS OF COMPLEX PROCESSING OF POMEGRANATE

Ziyaeva S.F., Vasina S.M., Tagirova M.A.

Faculty of Chemistry, Samarkand State University named after Sh.Rashidov, Department of Physical and Colloidal Chemistry, Samarkand, 140104, Universitety boulevard, 15, Uzbekistan
e-mail: mashxurat@mail.ru

The possibility of complex processing of pomegranate fruits of local varieties was studied. Based on experimental data on the enzymatic activity of amylase and pectinase, the optimal conditions for the depectization process in the production of clarified pomegranate juice concentrate are proposed. The factors influencing the extraction of antioxidants from pomegranate peel have been studied.

Keywords: pomegranate, extraction, antioxidants.

Limited raw material resources and environmentally harmful changes in nature raise the issue of developing a science-based integrated and environmentally safe technology for processing secondary raw materials and the need to create a new generation of food products balanced in terms of the main components: proteins, carbohydrates, fats, enzymes and others. biologically active substances [1]. These circumstances require careful consideration of the issues of studying the biotechnology of fruit and berry raw materials and their wastes when using pectolytic and amylolytic enzymes in the food industry, in particular, the canning and juice industries [2].

Pomegranates occupy an important place in the rational nutritional balance of human nutrition. The physicochemical properties of pomegranate fruit processing products are variable and depend on the place where the feedstock grows and how it is processed. The results of studies on the study of these properties serve as the basis for organizing the integrated production of pomegranate. Based on the obtained scientific data, it is possible to improve the technological scheme for the production of pomegranate extract and introduce a reasonable scheme for the integrated waste-free processing of pomegranate. For this reason, research work aimed at developing the scientific foundations for the complex processing of pomegranate fruits is an urgent problem that makes it possible to obtain pomegranate processing products with natural components of improved quality.

The objects of the study were the fruits of pomegranate varieties growing on the territory of Uzbekistan, technical juice and pulp. In the production of pomegranate juice, wastes account for up to 50 % of the mass of fruits received for processing in the form of peels and seeds.

On all lines, the same operations are carried out when obtaining pomegranate juice and its concentrate. However, the features of the technology have not yet made it possible to obtain a concentrate that has retained its natural color, without turbidity created by traces of its own proteins and acquired during gelatin processing. The content of pectin in pomegranate varieties growing on the territory of Uzbekistan is insignificant, and in some it is absent. However, given that several varieties of pomegranates are used as raw materials in the production of juice, the pulp was tested for the content of pectin substances using alcohol and starch - according to the iodine test. The results obtained showed that the fermentation process at the pulp processing stage can be omitted, and therefore the juice yield will not depend on the introduction of enzymes. When obtaining clarified juice, depectinization is necessary. In connection with the above, the activity of enzymes in the production of clarified pomegranate juice was studied. At the depectization stage, Amylase AG XXL and Pectinex Ultra Color are used. Enzymes were tested before use. The protein nature provides enzymes with the ability to change activity, characteristic of proteins, depending on various factors. The influence of temperature and pH on the rate of enzymatic reactions of the enzymes used was studied. Based on the data obtained, it was found that the optimal temperature value at which the reaction proceeds at the maximum rate is in the range of 37-50 ºC. The optimal value is pH 5.33, at which the reaction proceeds at the maximum rate. It is shown that after the enzymatic processing of juice, the enzyme remaining on activated carbon retains its 30-40 % enzymatic activity compared to the original one.

Thus, the process of extracting antioxidants from pomegranate peel has been studied. The optimal conditions for the isolation of soluble phenolic compounds by extraction with water as the most economical, safe and environmentally friendly solvent have been determined. It was found that the total quantitative content of phenolic compounds was 84.67 mg/g with an antioxidant activity of 18%.

References

1. Golubev V.N., Zhiganov I.N. Food biotechnology. - M. Deliprint, 2001 - 423 p.

2. Ivanova A.A., Voino L.I., I.Ivanova. Food biotechnology. M. Kolos S, 2008 - 427p.

3. Gafizov G.K. Studying the issues of complex processing of pomegranate fruits // Proceedings of the International Scientific and Practical Conference «Methodology of modern research». Dubai, UAE: Rost Publishing, 2015. – V. 1, – P. 15–27.

УДК 579.66 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-128-129

БИОМАССА НАСЕКОМЫХ И ЕЕ ПЕРЕРАБОТКА ДЛЯ ПИЩЕВЫХ ИЛИ КОРМОВЫХ ЦЕЛЕЙ

Ушакова Н.А., Бастраков А.И.

*ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН, Москва, Россия,
119071 Москва, Ленинский пр., д. 33
e-mail: naushakova@gmail.com*

Насекомые представляют собой возобновляемый источник белков и жиров. Однако его эффективное включение в состав пищевых и кормовых продуктов или в качестве ингредиента зависит от таких факторов, как восприятие потребителем, условия выращивания и технологические возможности. Важную роль играют методы извлечения белков и жиров, а также функциональные и технологические возможности белков и жиров насекомых.

Ключевые слова: насекомые, белок, липиды, биологически активные вещества, высушивание, экстракция, фракционирование

Насекомые, которые способны к культивированию в искусственных контролируемых условиях, являются устойчивым возобновляемым источником белка, липидов, витаминов, минералов и биологически активных веществ. Белки и липиды насекомых высоко питательны [1], поэтому они перспективны в качестве пищевых или кормовых ингредиентов. Однако целевое использование белков, масел и жиров насекомых требует получения химических и физических характеристик этих ингредиентов, а также определения их функциональных свойств. Это необходимо, чтобы оценить возможности введения в конкретные пищевые продукты или корма, а также для восприятия потребителем и мотивации принять этот новый источник.

Съедобные насекомые также являются источником для производства биологически активных пептидов и липидов в дополнение к использованию в качестве питательных веществ [2]. Биоактивные пептиды, полученные из белка насекомых, обладают широким спектром биологических свойств, включая антигипертензивные, иммуномодулирующие, противомикробные и антиоксидантные. Эти эффекты могут быть важны для укрепления здоровья человека и животных. Липиды содержат жирные кислоты и их глицериды, обладающие бактерицидными свойствами, способностью стимулировать иммунитет.

Для повышения выхода экстрагируемых белков и липидов из биомассы насекомых могут быть использованы различные технологии высушивания, дезинтеграции, ферментативная и микробиологическая обработка, в том числе, специфическими протеиназами, используемыми в промышленной переработке пищевых продуктов.

Интенсификация практического применения полезной биомассы насекомых затрагивает как вопросы технологии их культивирования, получения различных компонентов из биомассы насекомых, так и исследования свойств полученных ингредиентов. При этом важным является расширение видов насекомых, перспективных для их коммерческого выращивания.

Литература

1. *Van Huis A. Potential of insects as food and feed in assuring food security// Annual Review of Entomology. 2013. P. 563-583.*
2. *Tzompa-Sosa D.A., Fogliano V. Potential of Insect-Derived Ingredients for Food Applications// Insect Physiology and Ecology. Chapter 9. Publisher: Intech Ed. Vonnie D.C. Shields. 2017. P.215-231. DOI: 10.5772/67318*

UDC 579.66 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-128-129

INSECT BIOMASS AND ITS PROCESSING FOR FOOD OR FORAGE PURPOSES

N.A. Ushakova, A.I. Bastrakov

*Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Moscow, Leninkij pr.33
e-mail: naushakova@gmail.com*

Insects are a renewable source of protein and fat. However, the effective incorporation of insect biomass into food and feed products depends on factors such as consumer perception, growing conditions and technological capabilities. An important role is played by methods for extracting proteins and fats, as well as the functional and technological capabilities of insect proteins and fats.

Keywords: insects, protein, lipids, biologically active substances, drying, extraction, fractionation

Insects that are capable of cultivation under artificially controlled conditions are a sustainable renewable source of protein, lipids, vitamins, minerals and biologically active substances. Insect's proteins and lipids are highly nutritious [1], so they are promising as food or feed ingredients. However, the intended use of insect proteins, oils and fats requires obtaining the chemical and physical characteristics of these ingredients, as well as determining their functional properties. This is necessary to evaluate the possibilities of incorporation into specific foods or feeds, as well as consumer perception and motivation to accept this new source.

Edible insects are also a source for the production of bioactive peptides and lipids in addition to being used as nutrients [2]. Bioactive peptides derived from insect protein have a wide range of biological properties, including antihypertensive, immunomodulatory, antimicrobial, and antioxidant properties. These effects may be important for promoting human and animal health. Lipids contain fatty acids and their glycerides, which have bactericidal properties, the ability to stimulate the immune system.

To increase the yield of extractable proteins and lipids from insect biomass, various technologies of drying, disintegration, enzymatic and microbiological treatment, including specific proteinases used in industrial food processing, can be used.

The intensification of the practical application of useful insect biomass affects both the technology of their cultivation, the production of various components from insect biomass, and the study of the properties of the obtained ingredients. At the same time, it is important to expand insect species that are promising for their commercial cultivation.

References

1. *Van Huis A. Potential of insects as food and feed in assuring food security// Annual Review of Entomology. 2013. P. 563-583.*
2. *Tzompa-Sosa D.A., Fogliano V. Potential of Insect-Derived Ingredients for Food Applications// Insect Physiology and Ecology. Chapter 9. Publisher: Intech Ed. Vonnie D.C. Shields. 2017. P.215-231. DOI: 10.5772/67318*

О ПОДГОТОВКЕ ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ КАДРОВ, В ТОМ ЧИСЛЕ, ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

TRAINING OF HIGHLY QUALIFIED SPECIALISTS IN BIOTECHNOLOGY AND GENE ENGINEERING

1. О ПОДГОТОВКЕ КАДРОВ ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ «ПРОМЫШЛЕННАЯ ЭКОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИИ»
В САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОМ ПОЛИТЕХНИЧЕСКОМ УНИВЕРСИТЕТЕ ПЕТРА ВЕЛИКОГО
Базарнова Ю.Г., Аронова Е.Б. 132

ON STAFF TRAINING IN SPECIALTY «INDUSTRIAL ECOLOGY AND BIOTECHONOLOGY»
AT PETER THE GREAT SAINT PETERSBURG POLYTECHNIC UNIVERSITY
Yu.G. Bazarnova, E.B. Aronova 133

УДК 378.046.4 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-132-134

О ПОДГОТОВКЕ КАДРОВ ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ «ПРОМЫШЛЕННАЯ ЭКОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИИ» В САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОМ ПОЛИТЕХНИЧЕСКОМ УНИВЕРСИТЕТЕ ПЕТРА ВЕЛИКОГО

Базарнова Ю.Г., Аронова Е.Б.

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия, 194021, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29. e-mail: aronovae@inbox.ru

Представлена система организации комплексной подготовки специалистов-биотехнологов в Санкт-Петербургском политехническом университете Петра Великого.

Ключевые слова: подготовка кадров, специалист-биотехнолог

Устойчивое развитие региона нацелено на достижение высокого качества жизни населения при положительной динамике комплекса показателей, является комплексным процессом, который ведет к повышению условий жизни жителей региона с помощью достижения сбалансированности между социально-экономическим и экологическим развитием. Особое внимание уделяется развитию реального сектора экономики, для наращивания потенциала которой требуются кадровые ресурсы, обладающие необходимым набором профессиональных компетенций. Среди стремительно развивающихся в России отраслей в настоящее время отдельное внимание уделяется биоэкономике, под которой понимают любые отрасли производства, в которых задействованы биологические объекты и технологии, объединенные в понятие «биотехнологии».

Подготовка специалистов-биотехнологов в Санкт-Петербургском политехническом университете Петра Великого (СПбПУ) осуществляется в Высшей школе биотехнологий и пищевых производств (ВШБиПП), которая входит в структуру Института биомедицинских систем и биотехнологий (ИБСиБ).

Высшая школа создавалась как учебно-научное подразделение самого крупного в Северо-Западном регионе страны университета для подготовки квалифицированных инженерных кадров в сфере биотехнологии, биоиндустрии и развития научных исследований в сфере наук о жизни. Укрупненная группа специальностей «Промышленная экология и биотехнологии» ранее не реализовывалась в СПбПУ, поэтому это направление являлось новым и ориентировалось на создание новых образовательных программ бакалавриата, магистратуры и аспирантуры, как системы комплексной подготовки кадров в области современной биотехнологии на базе классической инженерно-политехнической образовательной платформы [1].

В настоящее время в ВШБиПП осуществляется подготовка специалистов для биотехнологических производств пищевой и фармацевтической промышленности, сельского хозяйства и здоровьесберегающих биотехнологий.

В 2020 году в ВШБиПП в рамках направления 19.06.01 – Промышленная экология и биотехнологии открылась образовательная программа аспирантуры направленности «Биотехнология». Образовательная программа имеет статус международной и реализуется в рамках научного центра мирового уровня «Цифровое моделирование и прогнозирование в медико-биологических системах». Необходимость открытия программы аспирантуры продиктована открытием диссертационного совета по научной специальности 1.5.6. Биотехнология.

Диссертационный совет имеет право присуждать ученые степени кандидата и доктора наук по научной специальности 1.5.6. Биотехнология по двум отраслям наук – техническим и биологическим. Совет является автономным, и его работа регламентируется основными локальными нормативными документами СПбПУ. В настоящее время диссертационный совет по специальности 1.5.6. Биотехнология является единственным советом в Северо-западном регионе по указанной научной специальности.

В заключении подчеркнем, что организация комплексной подготовки специалистов-биотехнологов высшей квалификации в СПбПУ является уникальной, поскольку позволяет готовить высококвалифицированные кадры в области современных производственных биотехнологий не только для промышленных предприятий отрасли и научно-исследовательских институтов, но и для продолжения научно-исследовательской и педагогической деятельности в ведущих университетах России, что является стратегически значимым критерием формирования кадрового резерва.

Литература

1. *Базарнова Ю.Г., Барсукова Н.В., Москвичева Е.В., Аронова Е.Б., Корж А.П. Высшая школа биотехнологий и пищевых производств Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого отметила пятилетний юбилей - Мясная индустрия – 2021. - №5.-С.48-51.*

UDC 378.046.4 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-132-134

ON STAFF TRAINING IN SPECIALTY «INDUSTRIAL ECOLOGY AND BIOTECHONOLOGY» AT PETER THE GREAT SAINT PETERSBURG POLYTECHNIC UNIVERSITY

Yu.G. Bazarnova, E.B. Aronova

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University (SPbPU)
Russia, 195251, Saint Petersburg, Polytechnicheskaya, 29,
e-mail: aronovae@inbox.ru e-mail: aronovae@inbox.ru*

The system of organization of complex training for biotechnologists at Peter the Great St. Pe-tersburg Polytechnic University is presented in this article.

Key words: training of personnel, specialist-biotechnologist

The sustainable development of the region is aimed at achieving a higher population's quality of life with the positive dynamics of a set of indicators, is thus a complex process that leads to improvements in the living conditions for the people of the region by achieving a balance between socio-economic and environmental development. Special attention is paid to the development of the real economy sector, for capacity building of which staff resources possessing the appropriate set of professional skills are needed. Amidst the rapidly evolving sectors in Russia, there is an emphasis on the bioeconomy, which may be defined as any sectors of production, where biological objects and technologies that are combined into the concept of «Biotechnology» are used.

Staff training of the biotechnologists at Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University (SPbPU) takes place in the Graduate School of Biotechnology and Food Science (GSB&FS), which is a part of the Institute of Biomedical Systems and Biotechnology.

The Graduate school was created as a scientific and educational unit of the biggest university in the north-western region of the country for engineering staff training in the fields of biotechnology, bioindustry, and research development in life sciences. A consolidated group of specialties «Industrial ecology and biotechnology» has never been implemented in SPbPU, therefore this field was new and was oriented on the creation of the new bachelor, master, and doctoral degree programs as a system of comprehensive staff training in the field of modern biotechnology based on classical engineering and polytechnic educational platform [1].

Currently, there is a specialists training provided in the GSB&FS for biotechnology industries of food and pharmaceutical sectors, agriculture and health-preserving biotechnologies.

In 2020, a postgraduate course in «Biotechnology» (including bionanotechnology) was opened under the specialty 19.06.01 – Industrial ecology and biotechnology. The educational program has an international status and is implemented by the world-class scientific center «Digital modeling and prediction in biomedical systems». The need to establish the postgraduate program was dictated by the opening of the dissertation council on the scientific specialty 1.5.6. Biotechnology.

The dissertation council is eligible to award Candidate and Doctor degrees of Sciences of Technology or Biology on scientific specialty 1.5.6. Biotechnology. The council is autonomous, and its work is regulated by the main local normative acts of SPbPU. At present, the dissertation council on specialty 1.5.6. Biotechnology is the only council in the north-western region on the aforementioned scientific specialty.

In conclusion, it should be emphasized that the organization of comprehensive staff training of biotechnology specialists in SPbPU is unique since it allows the highly-qualified staff training in the field of modern industrial biotechnology not only for industrial facilities of a sector and for educational research institutes, but also for the continuation of educational research and teaching activities in the leading universities of Russia, which is a strategically important criterion for reserve pool establishment.

Referenses

Bazarnova Yu.G., Barsukova N.V., Moskvicheva E.V., Aronova E.B., Korzh A.P. Graduate School of Biotechnology and Food Science SPbPU Peter the Great celebrated five years anniversary – Meat industry - 2021. - №5.-P.48-51.

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. ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ СОИ К ЗАСОЛЕННОСТИ ПОЧВ
ПУТЕМ ПРИМЕНЕНИЯ СОЛЕТОЛЕРАНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ
Смирнова И.Э., Саданов А.К., Баймаханова Г.Б, Файзулина Э.Р., Татаркина Л.Г. 137

INCREASING THE RESISTANCE OF SOYBEAN TO SOIL SALINITY
THROUGH THE APPLICATION OF SALTOLERANT MICROORGANISMS
I.E. Smirnova, A.K. Sadanov, G.B. Baimakhanova, E.R. Faizulina, L.G. Tatarkina 138

УДК 579.64 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-137-139

ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ СОИ К ЗАСОЛЕННОСТИ ПОЧВ ПУТЕМ ПРИМЕНЕНИЯ СОЛЕТОЛЕРАНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Смирнова И.Э., Саданов А.К., Баймаханова Г.Б, Файзулина Э.Р., Татаркина Л.Г.

ТОО «Научно-производственный центр микробиологи и вирусологии», Алматы, Казахстан
050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, д. 105
e-mail: iesmirnova@mail.ru

Соя не солеустойчивая агрокультура, одним из основных ограничений ее производства является засоленность почв. Из клубеньков сои, растущей на соленных почвах, были выделены и отселекционированы штаммы солетолерантных микроорганизмов - ризобий. Инокуляция семян штаммами ризобий, стимулировала всхожесть семян, рост растений и повышала устойчивость сои к засоленности почв.

Ключевые слова: солетолерантные ризобии, соя, инокуляция, засоленность почв, устойчивость, всхожесть, рост растений

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) является значимой культурой в мире и спрос на ее зерно с каждым годом увеличивается. Это объясняется рядом причин: семена сои характеризуются высоким содержанием белка и являются его основным источником в странах, где мясо и молочные продукты недоступны физически или экономически [1]. Поэтому выращивание сои помогает решить проблему дефицита пищевого и кормового белка. Однако соя относится к группе не солеустойчивых культур и засоленность почв является основным ограничением ее производства [2,3]. Так, засоление почвы порядка 0.1-0.4% снижает урожайность сои на 50% [4]. Одним из главных приемов повышения продуктивности сои является инокуляция ее семян ризобиями. Однако часто применение промышленных биоудобрений на засоленных почвах не эффективно, что обусловлено не приспособленностью ризобий, входящих в состав удобрений, к почвенным условиям, в частности, к засолению [5].

Целью исследования было выделение штаммов солетолерантных ризобий и изучение их способности повышать устойчивость растений сои к засолению. Из клубеньков сои, растущей на полях с сильным засолением (содержание солей в почвенном растворе 1,051%) были выделены и отобраны три изолята ризобий, способных выдерживать высокий солевой стресс (до 500 mM NaCl в среде). При отборе штаммов особое внимание уделяли нодулирующей активности ризобий. Молекулярно-генетическая идентификация показала, что штаммы относятся к *Bradyrhizobium japonicum* (процент идентичности по базе данных NCBI - 99,98%). Солеустойчивые микробы помогают растениям уменьшить солевой стресс используя различные механизмы: стимуляция роста растений за счет метаболитов, повышение мобилизации фосфатов, увеличение фиксации азота воздуха, снижение уровня этилена в растениях и др. Установлено, что исследуемые ризобии продуцируют фитогормон индолил-3-уксусную кислоту (IAA), синтезируют фермент ACC-дезаминазу и обладают высокой азотфиксирующей способностью. Показано, что инокуляция семян штаммами солетолерантных ризобий эффективно стимулируют рост сои на засоленных почвах. Так, сухой вес корней увеличился в 1,7-1,8 раз, стеблей - в 2,0-2,3 раза, листьев в - 2,5-3,5 раза, количество клубеньков в 2,3-2,6 раза по сравнению с контролем без инокуляции. Таким образом, при применении солетолерантных ризобий фитогормон IAA усиливает образование клубеньков, фермент АЦК-дезаминаза подавляет синтез этилена, стимулирует рост сои и повышает ее экологическую адаптацию к засолению. Эти результаты являются многообещающими при выращивании сои на засоленных почвах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант AP09259080).

Литература

1. *Wijewardana C., Reddy K. R., Bellaloui N. Soybean seed physiology, quality, and chemical composition under soil moisture stress // Food Chemistry. 2019. Vol. 278. P. 92-100.*
2. *Ilangumaran G., Schwinghamer T. D., Smith D. L. Rhizobacteria from root nodules of an indigenous legume enhance salinity stress tolerance in soybean // Frontiers in Sustainable Food Systems. 2021. Vol. 4. e617978.*
3. *Kamran M., Parveen A., Ahmar S., Malik Z. et al. An overview of hazardous impacts of soil salinity in crops, tolerance mechanisms, and amelioration through selenium supplementation // International Journal of Molecular Sciences. 2019. Vol.21(1). P. 148.*

4. Shuxin R., Chimera L., Guo-liang J., Abhishek P. Soybean salt tolerance 1(GmST1) reduces ROS production, enhances ABA sensitivity, and abiotic stress tolerance in Arabidopsis thaliana // Frontiers in Plant Science. 2016. Vol. 7. P. 445.

5. Смирнова И. Е., Баймаханова Г. Б., Файзулина Е. Р., Даугалиева С. Т., Татаркина Л. Г. Выделение и идентификация ризобий, перспективных для создания биоудобрения для культуры сои (Glycine max (L.) Merr.) // Научное обозрение. Биологические науки. - 2022. - № 1. - С. 38-43.

UDC 579.64 DOI: 10.37747/2312-640X-2023-21-137-139

INCREASING THE RESISTANCE OF SOYBEAN TO SOIL SALINITY THROUGH THE APPLICATION OF SALTOLERANT MICROORGANISMS

I.E. Smirnova, A.K. Sadanov, G.B. Baimakhanova, E.R. Faizulina, L.G. Tatarkina

LLC "Research and Production Center for Microbiology and Virology", Almaty, Kazakhstan
050010, Almaty, st. Bogenbai batyr, 105
e-mail: iesmirnova@mail.ru

Soybean is not a salt-tolerant crop, one of the main limitations of its production is soil salinity. Salt-tolerant microorganisms - rhizobia were isolated from soybean nodules growing on saline soils. Inoculation of seeds with rhizobia strains stimulated seed germination, plant growth and increased soybean resistance to soil salinity.

Key words: salt-tolerant rhizobia, soybean, inoculation, soil salinity, resistance, germination, plant growth

Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) is a significant crop in the world and the demand for its grain is increasing every year. This is due to a number of reasons: soybean seeds are characterized by a high protein content and are its main source in countries where meat and dairy products are not physically or economically available [1]. Therefore, the cultivation of soybean helps to solve the problem of deficiency of food and feed protein. However, soybean belongs to the group of non-salt-tolerant crops, and soil salinity is the main limitation of its production [2,3]. Thus, soil salinization of about 0.1–0.4% reduces soybean yield by 50% [4]. One of the main ways to increase soybean productivity is the inoculation of its seeds with rhizobia. However, the use of industrial biofertilizers on saline soils is often ineffective, which is due to the inability of the rhizobia included in fertilizers to soil conditions, in particular, to salinity [5].

The aim of the study was to isolate strains of salt-tolerant rhizobia and study their ability to increase the resistance of soybean plants to salinity. Three isolates of rhizobia capable of withstanding high salt stress (500 mM NaCl in the medium) were isolated and selected from soybean nodules growing in fields with high salinity (salt content in the soil solution 1.051%). When selecting strains, special attention was paid to the nodulation of rhizobia. Molecular genetic identification showed that the strains belong to *Bradyrhizobium japonicum* (the percentage of identity according to the NCBI database is 99.98%). Salt-tolerant microbes promote plants to reduce salt stress through various mechanisms: stimulation of plant growth due to metabolites, increased phosphate mobilization, increased air nitrogen fixation, reduced ethylene levels in plants, etc. It was found that the studied rhizobia produce the phytohormone indolyl-3-acetic acid (IAA), synthesize the enzyme ACC-deaminase, and have a high nitrogen-fixing ability. It has been shown that strains of salt-tolerant rhizobia effectively stimulate soybean growth on saline soils. Thus, the dry weight of the roots increased by 1.7-1.8 times, stems - by 2.0-2.3 times, leaves - by 2.5-3.5 times, the number of nodules - by 2.3-2.6 times. times compared to control without inoculation. Thus, when using salt-tolerant rhizobia, the IAA phytohormone enhances nodulation, the ACC-deaminase enzyme inhibits ethylene synthesis, stimulates soybean growth, and increases its ecological adaptation to salinity. These results are promising when growing soybeans in saline soils.

This research was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (grant AP09259080).

References

1. Wijewardana C., Reddy K. R., Bellaloui N. Soybean seed physiology, quality, and chemical composition under soil moisture stress // Food Chemistry. 2019. Vol. 278. P. 92-100.

2. Ilangumaran G., Schwinghamer T. D., Smith D. L. Rhizobacteria from root nodules of an indigenous legume enhance salinity stress tolerance in soybean // Frontiers in Sustainable Food Systems. 2021. Vol. 4. e617978.

3. Kamran M., Parveen A., Ahmar S., Malik Z. et al. An overview of hazardous impacts of soil salinity in crops, tolerance mechanisms, and amelioration through selenium supplementation // International Journal of Molecular Sciences. 2019. Vol.21(1). P. 148.

4. Shuxin R., Chimera L., Guo-liang J., Abhishek P. Soybean salt tolerance 1(GmST1) reduces ROS production, enhances ABA sensitivity, and abiotic stress tolerance in Arabidopsis thaliana // Frontiers in Plant Science. 2016. Vol. 7. P. 445.

5. Smirnova I. E., Baimakhanova G. B., Faizulina E. R., Daugalieva S. T., Tatarkina L. G. Isolation and identification of rhizobia promising for the creation of biofertilizer for soybean culture (Glycine max (L.) Merr.) // Scientific Review. Biological Sciences. 2022. № 1. P. 38-43.