

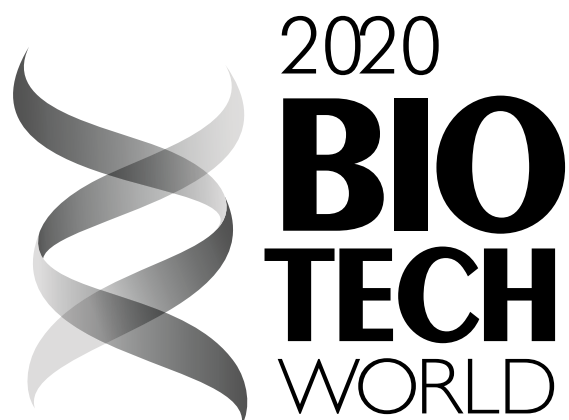
МАТЕРИАЛЫ ФОРУМА
FORUM PROCEEDINGS

БИОТЕХНОЛОГИЯ:
СОСТОЯНИЕ
И ПЕРСПЕКТИВЫ
РАЗВИТИЯ
МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ

BIOTECHNOLOGY:
STATE OF THE ART
& PERSPECTIVES
INTERNATIONAL FORUM

2022

MOSCOW
OCTOBER
28-30
ОКТАБРЯ
МОСКВА



WWW.BIOMOS.RU

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ

INTERNATIONAL FORUM

**БИОТЕХНОЛОГИЯ:
СОСТОЯНИЕ
И ПЕРСПЕКТИВЫ
РАЗВИТИЯ**

**BIOTECHNOLOGY:
STATE OF THE ART
AND PERSPECTIVES**

ВЫПУСК 18

ISSUE 18

28-30 ОКТЯБРЯ 2020
МОСКВА

28-30 OCTOBER, 2020
MOSCOW

**МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ
«БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И
ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ»**

Материалы международного форума
«Биотехнология: состояние и перспективы
развития»
28-30 ОКТЯБРЯ 2020 г.

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

Материалы тезисов публикуются в авторской
версии. Организаторы не несут ответственности
за неточности и опущения 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 978-5-6045396-0-6
ISSN: 2312-640X
DOI 10.37747/2312-640X-2020-18

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

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

**INTERNATIONAL FORUM «BIOTECHNOLOGY:
STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES»**

The proceedings of International forum
«Biotechnology: state of the art and perspectives»
28 - 30 OCTOBER, 2020.

DISCLAIMER

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

Opinions expressed may not necessarily reflect the
position of the Scientific Council of forum.
Information in the Biotechnology: state of the art and
perspectives» 2020 Forum 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 forum.

ISBN 978-5-6045396-0-6
ISSN: 2312-640X
DOI 10.37747/2312-640X-2020-18

Copyright © LTD «EXPO-BIOHIM-TECHNOLOGIES»
Pr-kt Olimpiiskii, d.10, c. 2, kv Moscow,
info@biomos.ru, www.biomos.ru

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

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENT

| | |
|--|-------|
| Организационный комитет / Organizing Committee | 3 / 4 |
| Программный комитет / Program Committee | 5 / 7 |
| Материалы форума | |
| 1. Геномная инженерия / Genetic engineering | |
| Новое в создании молекулярных инструментов редактирования ДНК и в конструировании регуляторных сетей / New in designing molecular tools of DNA editing and regulatory network | 9 |
| 2. Биотехнология и медицина / Biotechnology and medicine | |
| Бактериофаги в биотехнологии, сельском хозяйстве и медицине / Bacteriophages in biotechnology, medicine and agriculture | 20 |
| Биоматериалы нового поколения для медицины и промышленности / New generation biomaterials for medicine and industry | 29 |
| Болезни головного мозга: 21 век - состояние и что нас ожидает / Brain diseases in 21 century: state of the art and perspectives | 96 |
| Лечение онкозаболеваний человека с помощью природных и рекомбинантных вирусов / Natural and recombinant virus oncotherapy..... | 107 |
| Нанобиотехнологии в медицине / Nanobiotechnology in medicine | 113 |
| 3. 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..... | 192 |
| Биофармацевтика на Барском лугу 2020: научные и технологические тренды развития современных ферментных и антительных лекарственных препаратов / Biopharmacy on Barsky Lug 2020: scientific and technological trends in development of modern fermental and immune drugs..... | 224 |

| | |
|--|-----|
| От клеточных технологий к персонализированной медицине / From cell technologies to personalized medicine..... | 231 |
| 4. Биоинформатика и IT / Bioinformatics and IT | |
| Задачи биоинформатики в геномных исследованиях и разработке генетических технологий для здравоохранения, сельского хозяйства и промышленности / Bioinformatics tasks in gene researching and development of gene technologies for health care, agriculture and manufacturing industry | 245 |
| 5. Биоэкономика / Bioeconomics | |
| Биокаталитические технологии / Biocatalysis and technologies..... | 270 |
| Биологическая трансформация загрязнений в окружающей среде: закономерности и практические аспекты / Biological transformations of contaminants in the natural environment: patterns and practical aspects..... | 302 |
| Биотехнологические подходы в создании сельскохозяйственных культур в растениеводстве с улучшенными хозяйственно-ценными признаками / Biotechnology approach to crop development with economic characters in plant growing | 335 |
| Биотехнологические процессы в переработке минерального сырья / Biotechnology in processing of mineral raw materials | 361 |
| Генетические ресурсы и биотехнологические процессы для пищевой промышленности / Genetic resources and biotechnology processes in food industry | 369 |
| Генетические технологии в животноводстве: от развития фундаментальной науки до практического использования / Gene engineering in livestock: from fundamental studies to practical application | 434 |
| О подготовке высококвалифицированных биотехнологических кадров, в том числе, для генетических технологий/Training of highly qualified specialists in biotechnology and gene engineering | 441 |
| 6. Биотехнология / Biotechnology..... | 453 |

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 Габирович | 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, д.б.н. |
| 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 |
| Романовский Михаил Юрьевич | д.ф.-м.н., директор Департамента государственной научной и научно- технической политики Минобрнауки России |
| 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 Gorbатов 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 |
| M.Yu. Romanovskiy | doctor of Science (Physics and Mathematics), head of Department of state policy for science and technology Ministry for science and higher education |
| 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 |
| Яненко Александр Степанович | д.б.н., профессор, директор НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика, сопредседатель Программного комитета |
| Алешников Владимир Евгеньевич | научный руководитель конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» и выставки «Мир биотехнологии-2020», ответственный секретарь Оргкомитета |
| Арчаков Александр Иванович | академик РАН, научный руководитель Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, сопредседатель Оргкомитета |
| Васильев Андрей Валентинович | член-корреспондент РАН, профессор, д.б.н., 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 факультета 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 Наталья 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-корреспондент 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 ФБГНУ ВНИИПБТ |
| Седельникова Галина Васильевна | д.т.н. профессор, зам. Директора ЦНИГРИ |
| Титов Евгений Иванович | академик РАН, заведующий 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» |
| Харитонов Владимир Дмитриевич | профессор, д.т.н., академик РАН, научный руководитель ГНУ ВНИИ молочной промышленности |
| 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 |

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 |
| Alexander I. Archakov | academician of RAS, academic Leader of Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, the Russian Academy of Medical Sciences, co-chair of the Organizing Committee |
| Alexander S. Yanenko | grand PhD (Biology), professor, director of FGUP GosNIIgenetica State Research Center, 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, Mendeleev 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 |
| Vladimir D. Kharitonov | academician of RAS, professor, doctor of science (Technology), Science director of National Research Institute of Dairy Industry |
| 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 Enzymology 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 of 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 Gorbатов FGBNU VNIIMP |
| Sergey A. Lukyanov | academician of RAS, rector of Pirogov Russian National Research Medical University |
| Alexander G. Majouga | professor of RAS, rector of Mendeleev 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, Mendeleev 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 Mendeleev 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 |
| Vladimir A. Potapkin | head of Chemical Engineering and Timber Processing Complex Department, Minpromtorg Russia |
| Lubov' .V. Rimareva | academician of RAS, grand PhD (Technical Science), professor, FGBNU VNIIPBT |
| Galina V. Sedelnikova | professor, deputy director, Central Research Institute of Geological Exploration of Non-Ferrous and Noble Metals |
| 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 |

ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

GENETIC ENGINEERING

НОВОЕ В СОЗДАНИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНСТРУМЕНТОВ РЕДАКТИРОВАНИЯ ДНК И В КОНСТРУИРОВАНИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ СЕТЕЙ

NEW IN DESIGNING MOLECULAR TOOLS OF DNA EDITING AND REGULATORY NETWORK

*Руководитель секции С.И. Куцев, д.м.н., член-корреспондент РАН, директор ФГБНУ «МГНЦ» /
S.I. Kutsev, corresponding member of RAS, PhD Medicine, director of Research Centre for Medical Genetics FSBSI*

| | |
|---|----|
| 1. БИОСИНТЕЗ 3-ГИДРОКСИФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ С4-С8 АЛИФАТИЧЕСКИХ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ ГЛЮКОЗЫ ПО ОБРАЩЕНОМУ ПУТИ БЕТА-ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ РЕКОМБИНАТНЫМИ ШТАММАМИ ESCHERICHIA COLI Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г..... | 10 |
| BIOSYNTHESIS OF 3-HYDROXYFUNCTIONALIZED C4-C8 ALIPHATIC CARBOXYLIC ACID FROM GLUCOSE THROUGH INVERTED FATTY ACID BETA-OXIDATION PATHWAY BY RECOMBINANT ESCHERICHIA COLI STRAINS Gulevich A.Yu., Skorokhodova A.Yu., Debabov V.G. | 11 |
| 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОДУКЦИИ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ В БИОРЕАКТОРЕ ICCELLIS NANO Дженкова М.А., Васильева С. Г., Веляев О.А., Галкин И.И., Зотиков А.А., Логинов В.А., Старикова А.В., Скопенкова В.В., Трушкин Н.А., Цвиркун Д.В., Хаматова А.Ю., Шмидт А.А., Егорова Т.В..... | 11 |
| COMPARATIVE PRODUCTION EFFICIENCY EVALUATION OF ADENO-ASSOCIATED VIRUSES IN THE ICCELLIS NANO BIOREACTOR Dzhenkova M.A., Vassilieva S. G., Velyaev O.A., Galkin I.I., Zoticov A.A., Loginov V.A., Starikova A.B., Skopenkova V.V., Trushkin N.A., Tsvircun D.V., Khamatova A.Y., Shmidt A.A., Egorova T.V. | 12 |
| 3. СИСТЕМА CRISPR/CAS9, НАПРАВЛЕННАЯ НА ГЕНЫ РЕПЛИКАТИВНОГО КОМПЛЕКСА ВПГ, ПОДАВЛЯЕТ ИНФЕКЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ВИРУСА В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ Климова Р.Р., Демидова Н.А., Карпов Д.С., Куц А.А. | 13 |
| THE CRISPR/CAS9 SYSTEM TARGETING GENES OF HSV- REPLICATIVE COMPLEX SUPPRESSES THE INFECTIOUS ACTIVITY OF THE VIRUS IN MAMMAL CELLS Klimova R.R., Demidova N.A., Karpov D.S., Kushch A.A..... | 15 |
| 4. ИНТЕНСИВНЫЙ СИНТЕЗ БЕЛКА С СИГНАЛОМ ЯДЕРНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ СТИМУЛИРУЕТ РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСА В РАСТЕНИИ Комарова Т.В., Шешукова Е.В., Ершова Н.М., Дорохов Ю.Л. | 16 |
| THE NUCLEAR LOCALIZATION SEQUENCE OF A MASSIVELY SYNTHESIZED PROTEIN DRAMATICALLY INCREASES PLANT VIRUS REPRODUCTION Komarova T.V., Sheshukova E.V., Ershova N.M, Dorokhov Y.L. | 17 |
| 5. КОНСТРУИРОВАНИЕ МЕТОДАМИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ОПУХОЛЬ-СПЕЦИФИЧНЫХ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ТРОПИЗМОМ И УСИЛЕННОЙ ОНКОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ Степаненко А.А., Сосновцева А.О., Чехонин В.П..... | 18 |
| THE CONSTRUCTION OF TUMOR-SELECTIVE ADENOVIRAL VECTORS WITH MODIFIED TROPISM AND INCREASED ONCOLYTIC ACTIVITIES USING ADVANCED GENETIC ENGINEERING Stepanenko A.A., Sosnovtseva A.O., Chekhonin V.P..... | 19 |

УДК 577.121 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-10-11

БИОСИНТЕЗ 3-ГИДРОКСИФУНКЦИОНИЛИРОВАННЫХ C4-C8 АЛИФАТИЧЕСКИХ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ ГЛЮКОЗЫ ПО ОБРАЩЕНОМУ ПУТИ БЕТА-ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ РЕКОМБИНАТНЫМИ ШТАММАМИ *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

Показана возможность биосинтеза из глюкозы 3-гидроксифункционализованных C4-C8 карбоксилатов при обращении бета-окисления жирных кислот в рекомбинантных штаммах *Escherichia coli*.

Ключевые слова: 3-гидроксифункционализованные карбоновые кислоты, бета-окисление жирных кислот, *Escherichia coli*, метаболическая инженерия

3-гидроксифункционализованные алифатические карбоновые кислоты, обладающие хиральным центром, служат удобными синтонами для стереоселективного синтеза широкого спектра фармако- и агрохимически-значимых соединений, включая пестициды, инсектициды, феромоны и синтетические бета-лактамы антибиотики. Перспективным биохимическим путем получения соответствующих кислот, обладающих (S)-стереоконфигурацией, из дешевого и доступного возобновляемого сырья, такого, как сахара растительной биомассы, и, в первую очередь, глюкоза, является обращенное бета-окисление жирных кислот (БОЖК). При этом циклическая природа процесса потенциально позволяет обеспечить синтез целевых соединений с варьирующейся длиной цепи. Ранее сконструированный штамм *Escherichia coli* BOX-3 $\Delta 4$ $P_{\text{L-atoB}}$ $P_{\text{L-tesB}}$ $\Delta yciA$ (MG1655 IacI^{R} $P_{\text{L-SD}_{\text{phi10}}}$ -atoB , $P_{\text{trc-ideal-4}}$ $\text{-SD}_{\text{phi10}}$ -fadB , $P_{\text{trc-ideal-4}}$ $\text{-SD}_{\text{phi10}}$ -fadE , $P_{\text{L-SD}_{\text{phi10}}}$ -tesB , $\Delta \text{ackA-pta}$, ΔpoxB , ΔldhA , ΔadhE , ΔyciA), экспрессирующий гены, кодирующие ключевые ферменты аэробного БОЖК, под контролем искусственных регуляторных элементов, не синтезировал, в условиях тестовой пробирочной ферментации при индукции экспрессии целевых генов, заметных количеств 3-гидроксикарбоновых кислот, отличных от 3-гидроксимасляной. Это свидетельствовало лишь о частичном однократном обращении в штамме цикла БОЖК. В *E. coli* терминальную реакцию цикла способны катализировать ацил-КоА дегидрогеназа и еноил АПБ-редуктаза, продукты генов *fadE* и *fabI*, соответственно. Таким образом, хромосомных копий данных генов было недостаточно для обеспечения в штамме активности соответствующих ферментов, способствующей многократному обращению цикла. При индуцированной экспрессии гена *fadE* в составе плазмиды pMW118 под контролем промотора $P_{\text{trc-ideal-2}}$ штамм синтезировал из глюкозы не только 310 мг/л 3-гидроксимасляной кислоты, но и 6,4 мг/л 3-гидроксигексановой и 0,18 мг/л 3-гидроксиоктановой кислот. Аналогичная экспрессия в штамме гена *fabI* приводила к формированию 340 мг/л 3-гидроксимасляной, 7,3 мг/л 3-гидроксигексановой и 0,36 мг/л 3-гидроксиоктановой кислот. Полученные результаты экспериментально подтверждают потенциал обращенного БОЖК как перспективной биохимической платформы для реализации эффективного микробиологического синтеза целевых продуктов. Тогда как длина углеродной цепи финального продукта может регулироваться выбором фермента катализирующего финальную стадию цикла, эффективность всего биосинтетического процесса напрямую зависит от обеспечения в клетке пропорционального уровня активности всех вовлеченных ферментов.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект №18-29-08059).

UDC 577.121 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-10-11

BIOSYNTHESIS OF 3-HYDROXYFUNCTIONALIZED C4-C8 ALIPHATIC CARBOXYLIC ACID FROM GLUCOSE THROUGH INVERTED FATTY ACID BETA-OXIDATION PATHWAY BY RECOMBINANT ESCHERICHIA COLI STRAINS

Gulevich A.Yu., Skorokhodova A.Yu., Debabov V.G.

Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Science», Moscow, Russia
117312, Moscow, 60 let Oktjabrja pr-t, 7, bld. 1
e-mail: andrey.gulevich@gmail.com

The feasibility of the biosynthesis from glucose of 3-hydroxyfunctionalized C4-C8 carboxylates upon the reversal of the fatty acid beta-oxidation in recombinant *Escherichia coli* strains has been demonstrated.

Key words: 3-hydroxyfunctionalized carboxylic acids, fatty acid beta-oxidation, *Escherichia coli*, metabolic engineering

3-hydroxyfunctionalized aliphatic carboxylic acids possessing a chiral center can serve as useful synthons for the stereoselective synthesis of wide array of pharmaco- and agriculturally valuable chemicals, including pesticides, insecticides, pheromones, and synthetic beta-lactam antibiotics. Inverted fatty acid beta-oxidation (BOX) is a prospective biochemical pathway for the production of the respective acids with (S)-stereoconfiguration from the cheap and renewable raw materials, such as plant-derived sugars, particularly, glucose. The cyclic nature of the process could potentially ensure synthesis of the target compounds with varying chain length. Previously engineered *Escherichia coli* strain BOX-3 $\Delta P_{L-atoB} P_{L-tesB} \Delta yciA$ (MG1655 $lacI^q P_{L-SD_{\phi 10}}-atoB, P_{trc-ideal-4}-SD_{\phi 10}-fadB, P_{trc-ideal-4}-SD_{\phi 10}-fadE, P_{L-SD_{\phi 10}}-tesB, \Delta ackA-pta, \Delta proxB, \Delta ldhA, \Delta adhE, \Delta yciA$), which expresses genes encoding key BOX enzymes under the control of artificial regulatory elements, did not produce 3-hydroxyacids other than 3-hydroxybutyrate during the trial tube-scale fermentation upon the induction of the target genes. This indicated that only partial one-turn BOX reversal occurred in the strain. Acyl-CoA dehydrogenase and enoyl-ACP reductase, i.e. the products of *fadE* and *fabI* genes, can catalyze in *E. coli* the terminal stage of BOX cycle. The native chromosomal copies of these genes failed to ensure in the strain the activity of the respective enzymes sufficient for multi-turn operation of the inverted cycle. Upon the induced expression of *fadE* from pMW118-derived plasmid under the control of $P_{trc-ideal-2}$ promoter the strain synthesized from glucose not only 310 mg/L 3-hydroxybutyrate, but also 6.4 mg/L 3-hydroxyhexanoate and 0.18 mg/L 3-hydroxyoctanoate. Similar plasmid-mediated expression of *fabI* led to the formation of 340 mg/L 3-hydroxybutyrate, 7.3 mg/L 3-hydroxyhexanoate and 0.36 mg/L 3-hydroxyoctanoate by the strain. The obtained results experimentally prove the potential of inverted BOX to serve as prospective biochemical platform for realization of efficient microbial synthesis of target products. While the carbon chain length of final product can be determined by the choice of the enzyme catalyzing last stage of the cycle the efficiency of entire biosynthetic process directly depend on the intracellular balance of all involved enzymes.

Funding: The work was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research (project #18-29-08059).

УДК 57.083.224 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-11-13

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОДУКЦИИ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ В БИОРЕАКТОРЕ ICCELLIS NANO

Дженкова М.А.^{1,2}, Васильева С. Г.^{1,2}, Веляев О.А.^{1,2}, Галкин И.И.^{1,3,4}, Зотиков А.А.², Логинов В.А.^{1,2}, Старикова А.В.^{1,2}, Скопенкова В.В.^{1,2,4}, Трушкин Н.А.^{1,2}, Цвиркун Д.В.^{1,3,4}, Хаматова А.Ю.^{1,4}, Шмидт А.А.^{1,2,4}, Егорова Т.В.^{1,2}

¹ ИБГ РАН, 119334, город Москва, улица Вавилова, дом 34/5

² ООО «Марлин Биотех»

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

⁴ ЦВРГТБ ИБГ РАН (центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины)

e-mail: m.dzhenkova.marlin@gmail.com

Представлены результаты по оптимизации условий продукции рекомбинантного аденоассоциированного вируса в клетках HEK293T с использованием биореактора iCellis Nano.

Ключевые слова: рекомбинантный аденоассоциированный вирус, миодистрофия Дюшенна, адгезивный биореактор iCellis Nano, генная терапия

Миодистрофия Дюшенна (МДД) вызывается мутацией в гене дистрофина, характеризуется отсутствием одноименного белка и прогрессирующей дегенерацией мышечных тканей. Доставка укороченной формы дистрофина в ткани с помощью rAAV (recombinant adeno-associated viruses) рассматривается как наиболее перспективный подход для лечения МДД. Основным этапом изучения эффективности и безопасности генотерапевтического лекарственного препарата является проведение доклинических испытаний. Цель данной работы – оценить возможность крупномасштабной наработки rAAV в биореакторе iCellis Nano (Pall Corporation) и перспективу использования полученного генотерапевтического препарата в доклинических и первых этапах клинических испытаний.

Было проведено 6 сравнительных экспериментов по оптимизации производственного процесса с использованием двух биореакторов. Эксперименты проводились по ранее отработанной технологии методом транзитной тройной трансфекции клеток HEK293T в биореакторе с площадью роста 0,8 м², 1,6 м² или 4 м². Лизис проводили в биореакторе, лизат концентрировали и вирусные частицы выделяли методом ультрацентрифугирования в градиенте йодиксанола с последующим диализом препарата. В экспериментах варьировали объем среды во время трансфекции, объем и время инкубации трансфекционной смеси, а также режим рециркуляции среды в системе биореактора. Также проведен сравнительный анализ эффективности сборки вирусных частиц в биореакторах с разной площадью. Использование iCellis Nano с непрерывным перемешиванием среды показывает двукратное повышение выхода вирусных частиц (7,55E+10ГК/см² по сравнению с 3,63E+10ГК/см², n=3). Увеличение времени инкубирования трансфекционной смеси приводит к повышению выхода на 8%. Двукратное увеличение объема трансфекционной смеси приводит к 20% увеличению выхода в сравнительном эксперименте и 50% увеличению выхода над средней эффективностью продукции. Уменьшение общего объема среды с 0,113мл/см² до 0,1мл/см² не влияет существенно на продуктивность (5,52ГК/см² и 5,58ГК/см² соответственно).

Оптимизированный протокол впоследствии применяли для продукции rAAV суммарно в 32 одноразовых камерах iCellis, общая площадь которых составила 98,4 м². Средняя эффективность продукции вирусных частиц составила 5,17E+10ГК/см² (n=32) и в отдельных экспериментах достигала 1,34E+11ГК/см². При увеличении площади с 0,8 м² до 1,6 м² и 4 м² эффективность продукции вирусов уменьшалась примерно в два раза (9,58E+10ГК/см² (n=2), 4,81E+10ГК/см² (n=15) и 5,09E+10ГК/см² (n=19) соответственно). Данная методика продукции rAAV позволяет стабильно получать 2,33E+09ГК/см² стерильного концентрированного препарата с соответствующими показателями качества (эффективность *in vivo*, отсутствие посторонних белков, дефектных вирусных частиц, эндотоксинов). Количество полученного в результате проведенной работы препарата (5,09E+16ГК) является достаточным для проведения доклинических испытаний. Дальнейшее масштабирование процесса с увеличением количества биореакторов адгезивного типа приемлемо для лабораторного или опытно-промышленного производства. Для обеспечения проведения клинических испытаний и полномасштабного промышленного производства в соответствии с требованиями GMP необходимо рассматривать альтернативные методы производства.

UDC 57.083.224 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-11-13

COMPARATIVE PRODUCTION EFFICIENCY EVALUATION OF ADENO-ASSOCIATED VIRUSES IN THE ICELLIS NANO BIOREACTOR

Dzhenkova M.A.^{1,2}, Vassilieva S. G.^{1,2}, Velyaev O.A.^{1,2}, Galkin I.I.^{1,3,4}, Zoticov A.A.², Loginov V.A.^{1,2}, Starikova A.B.^{1,2}, Skopenkova V.V.^{1,2,4}, Trushkin N.A.^{1,2}, Tsvircun D.V.^{1,3,4}, Khamatova A.Y.^{1,4}, Shmidt A.A.^{1,2,4}, Egorova T.V.^{1,2}

¹ IGB RAS, 119334, Moscow, Vavilova street, 34/5

² Marlin Biotech LTD

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

⁴ Centre for High-Sensitive Editing and Genetic Technology for Biomedicine (CHSEGTB) IGB RAS
e-mail: m.dzhenkova.marlin@gmail.com

Here we present results of condition optimisation for production of recombinant adeno-associated virus using iCellis Nano bioreactor for HEK293T cells.

Key words: recombinant adeno-associated virus, Duchenne muscular dystrophy, bioreactor for adhesive cells, gene therapy

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe disorder caused by mutations in the DMD gene. Dysfunction of dystrophin protein leads to progressive weakness and rhabdomyolysis. Gene therapy which is based on rAAV (recombinant adeno-associated viruses) delivery of shortened dystrophin gene is a promising approach for DMD treatment. One of the key steps of gene therapy product development is preclinical trials. Our aim is to test iCellis Nano bioreactor (Pall Corporation) as a tool to upscale rAAV production and to estimate the possibility of using the produced rAAV in preclinical trials.

We performed 6 comparative experiments on scaling up the production of rAAV in two iCellis Nano bioreactors. HEK293T cells were triple transfected in a bioreactor with growth areas 0,8m², 1,6m² or 4m² using a previously developed protocol. After virus accumulation cells were lysed in medium, crude lysate was concentrated and viral particles were purified by iodixanol gradient ultracentrifugation and subsequent dialysis. In these experiments the following parameters varied: volume of medium in a bioreactor, volume of transfection mixture, transfection complexes formation time and medium recirculation regimen. Comparative analysis of production effectiveness relative to the growth area was performed. Non-stop recirculation regimen in iCellis Nano bioreactor shows up to 2 times enrichment in rAAV yield (7,55E+10 GC/cm² compared to 3,63E+10 GC/cm², n=3). Transfection complexes formation time prolongation can increase yield by 8%. We were able to increase production efficiency 1.5 times by doubling the transfection mixture volume. Reduction of medium volume in the bioreactor from 0.113 ml/cm² to 0.1 ml/cm² at the transfection step had no influence on production efficiency (5.52 GC/cm² and 5.58 GC/cm² accordingly).

Optimized protocol was used for production of rAAV in 32 single use iCellis bioreactors with a total area of 98.4 m². Average effectiveness of virus production was 5.17E+10 GC/cm² (n=32) and reached 1.34E+11 GC/cm² in particular experiments. Upscaling from 0.8m² to 1.6m² and 4m² decreased virus titer produced from 9.58E+10 GC/cm² (n=2) to 4.81E+10 GC/cm² (n=15) and 5.09E+10 GC/cm² (n=19) correspondingly. The method described allows to stably get 2.33E+09 GC of sterile concentrated viral sample with desired quality parameters (absence of contaminating proteins and bacterial endotoxins, percentage of empty viral particles and etc.) per 1 cm² of bioreactor area. Activity of rAAV was confirmed *in vivo*.

Obtained quantity of rAAV sample (5,09E+16 GC) is sufficient for preclinical trials. Further optimization and upscaling with increased number of iCellis Nano bioreactors can be used for pilot production. To ensure clinical trials and GMP compliant commercial production, alternative manufacturing methods must be considered.

УДК 578.23 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-13-15

СИСТЕМА CRISPR/CAS9, НАПРАВЛЕННАЯ НА ГЕНЫ РЕПЛИКАТИВНОГО КОМПЛЕКСА ВПГ-1, ПОДАВЛЯЕТ ИНФЕКЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ВИРУСА В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Климова Р.Р.¹, Демидова Н.А.¹, Карпов Д.С.², Куц А.А.¹

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, подразделение Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, Москва, Российская Федерация;

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Российская Федерация;
123098 г. Москва, ул. Гамалеи 16, e-mail: rklimova@yandex.ru

Изучена способность CRISPR/Cas9 плазмид, направленных на различные гены ВПГ-1, ингибировать ВПГ-1-инфекцию *in vitro*. Было показано, что плазмиды CRISPR/Cas9, кодирующие две направляющие РНК, нацеленные на гены UL52 и UL29 праймазно-геликазного комплекса, полностью подавляла репродукцию вируса в культуре клеток Vero.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, вирус простого герпеса I типа, герпесвирусная инфекция *in vitro*, культура клеток Vero.

Вирус простого герпеса 1 типа (ВПГ-1) является одним из самых распространенных вирусов человека. По оценкам ВОЗ, ВПГ-1 инфицированы в среднем около 67% населения [1]. У большинства первично инфицированных людей вирус переходит в латентную форму, устойчивую к действию противовирусных препаратов. Кроме того, появляются лекарственно устойчивые штаммы герпесвирусов [2]. В связи с этим активно проводятся поиски новых терапевтических подходов. Одним из перспективных подходов

к лечению латентной герпесвирусной инфекции рассматривается технология редактирования геномов с использованием системы CRISPR/Cas9 [3-5]. С использованием клеточных моделей показано, что система CRISPR/Cas9 эффективно подавляет ВПГ-инфекцию в составе лентивирусных векторов, встраиваемых в геном [6]. Однако возникают вопросы по безопасности такого способа доставки компонентов системы CRISPR/Cas9, связанные с интегративным мутагенезом лентивирусных векторов и накоплением мутаций из-за продолжительного действия постоянно активной CRISPR/Cas9 системы. Кроме того, защита клеток от ВПГ-инфекции с помощью лентивирус-экспрессируемой CRISPR/Cas9 системы теряет через 24 часа. Это стимулирует поиски других эффективных и более безопасных векторов и способов доставки компонентов системы CRISPR/Cas9.

Цель работы – оценить способность CRISPR/Cas9 системы, экспрессируемой с плазмид, направленных на различные гены ВПГ-1, подавлять ВПГ-1-инфекцию в зараженных клетках.

В работе использовали следующие плазмиды системы CRISPR/Cas9: пустой вектор PX458, кодирующий SpCas9 и структурную часть sgRNA, и его производные с клонированными спейсерами против генов ВПГ1: $\alpha 0$, UL8, UL29 и UL52. Клетки Vero трансфицировали плазмидами с использованием Lipofectamin 3000 и через 48 ч изучали цитотоксичность методом МТТ. Далее клетки Vero, трансфицированные плазмидами, заражали ВПГ1 с инфекционной множественностью 0.01 БОЕ/мл. Количество ВПГ1-инфицированных клеток выявляли иммуноцитохимическим окрашиванием, используя моноклональные антитела к позднему структурному белку gB ВПГ.

Показана высокая эффективность трансфекции клеток Vero плазмидами системы CRISPR/Cas9 (>50%) без их значимого цитотоксичного действия (>70% живых клеток в трансфицированной популяции). Изучение противовирусных свойств CRISPR/Cas9 плазмид, показало, что плазида, кодирующая один спейсер против гена $\alpha 0$ не ингибировала ВПГ1-инфекцию в клетках Vero. В то время как плазмиды, кодирующие по два спейсера и направляющие систему CRISPR/Cas9 на гены репликативного комплекса ВПГ (UL8-UL29 и UL52-UL29) снижали долю инфицированных клеток до 16.5%-25%. В то же время одна из плазмидных CRISPR/Cas9 конструкций против генов UL52-UL29 воспроизводимо обеспечивала 100%-ное ингибирование ВПГ1-инфекции клеток в течение 48 часов.

Полученные результаты указывают на перспективность использования системы CRISPR/Cas9, экспрессированной с плазмиды, при разработке новых стратегий борьбы с герпесвирусными инфекциями.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований № 19-04-01218 и № 18-29-07021.

Литература

1. Looker K.J., Magaret A.S., May M.T., Turner K.M., Vickerman P., Gottlieb S.L. et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012 // *PLoS One*. 2015. Vol. 10. №10. e0140765.
2. Piret J., Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2011. Vol. 55. P. 459–472.
3. Lin C., Li H., Hao M., Xiong D., Luo Y., Huang C. et al. Increasing the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing of HSV-1 virus in human cells // *Sci. Rep*. 2016. Vol. 6. P. 34531.
4. Roehm P.C., Shekarabi M., Wollebo H.S., Bellizzi A., He L., Salkind J., Khalili K. Inhibition of HSV-1 replication by gene editing strategy // *Sci. Rep*. 2016. Vol. 6. P. 23146.
5. Xu X., Fan S., Zhou J., Zhang Y., Che Y., Cai H. et al. The mutated tegument protein UL7 attenuates the virulence of herpes simplex virus 1 by reducing the modulation of alpha-4 gene transcription // *Virology*. Vol. 13. P. 152.
6. van Diemen F.R., Kruse E.M., Hooykaas M.J., Bruggeling C.E., Schurch A.C., van Ham P.M. et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of herpesviruses limits productive and latent infections // *PLoS Pathogens*. 2016. Vol. 12. P. e1005701.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-13-15

THE CRISPR/CAS9 SYSTEM TARGETING GENES OF HSV-1 REPLICATIVE COMPLEX SUPPRESSES THE INFECTIOUS ACTIVITY OF THE VIRUS IN MAMMAL CELLS

Klimova R.R.¹, Demidova N.A.¹, Karpov D.S.², Kushch A.A.¹

¹"N.F. Gamaleya National Center of Epidemiology and Microbiology", Ivanovsky Institute of Virology, The Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

²"Engelhardt Institute of Molecular Biology" Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation; 123098, Moscow Gamaleya str 16. e-mail: rklimova@yandex.ru

The ability of CRISPR/Cas9 plasmids encoding various HSV-1 genes to inhibit HSV-1 infection *in vitro* was studied. It was shown that CRISPR/Cas9 plasmids encoding two gRNA targeted against UL52 and UL29 genes of the HSV1 primase-helicase complex suppressed the viral reproduction in a Vero cell culture completely.

Key words: CRISPR/Cas9; Herpes Simplex Virus type 1; Herpes Virus Infection *in vitro*, Vero cells.

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is a widespread human virus. According to the WHO, the virus infects nearly 67% of world's population [1]. In the majority of primarily infected individuals HSV-1 becomes latent and resistant to all antiviral drugs [2]. Moreover, new drug-resistant HSV strains have emerged, which urges the search for new therapeutic strategies. Genome editing technology using CRISPR/Cas9 system has been proposed as one of the perspective approaches. CRISPR/Cas9 system expressed from lentiviral vectors effectively suppresses HSV infection in a cell model [3-5]. However, safety issues can arise from integrative mutagenesis of lentiviral vectors and accumulation of mutations associated with a long-term action of permanently active CRISPR/Cas9 system [6]. In addition, cell protection against HSV provided by lentivirus-expressed CRISPR/Cas9 is lost after 24 h. This instigates further search for other effective and safe vectors and means of CRISPR/Cas9 targeting.

Our goal was to evaluate the ability of CRISPR/Cas9 expressed from plasmids targeted at various HSV-1 genes to suppress HSV-1 infection in cells.

The following CRISPR/Cas9 plasmids were used: empty PX458 vector coding for SpCas9 and structural fragment of sgRNA, and the vector derivatives with cloned spacers against $\alpha 0$, UL8, UL29 and UL52 HSV-1 genes. The plasmids were transfected into Vero cells using Lipofectamin 3000, and cytotoxicity was assessed by MTT assay. Then transfected cells were infected with HSV-1 and quantified by immunocytochemical staining using an anti-gB monoclonal antibody.

Transfection with CRISPR/Cas9 plasmids has shown high effectiveness (>50%) in Vero cells with low cytotoxicity (>70% live cells in transfected population). Plasmids encoding for a single spacer against dispensable $\alpha 0$ gene did not inhibit HSV-1 infection in Vero cells, while plasmids encoding for two spacers and targeting CRISPR/Cas9 system at HSV-1 replication complex genes (UL8-UL29 and UL52-UL29) decreased the percentage of infected cells up to 16.5-25%. One of the plasmids targeted at UL52-UL29 genes provided a 100% inhibition of HSV-1 infection for 48 h and up to 6 days.

The results obtained indicate that plasmid-expressed CRISPR/Cas9 system is a perspective candidate for the development of new therapeutic strategies to combat herpesviral infections.

The study was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research, projects no.19-04-01218 and no. 18-29-07021.

References

1. Looker K.J., Magaret A.S., May M.T., Turner K.M., Vickerman P., Gottlieb S.L. et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012 // *PLoS One*. 2015. Vol. 10. №10. e0140765.
2. Piret J., Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2011. Vol. 55. P. 459–472.
3. Lin C., Li H., Hao M., Xiong D., Luo Y., Huang C. et al. Increasing the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing of HSV-1 virus in human cells // *Sci. Rep*. 2016. Vol. 6. P. 34531.
4. Roehm P.C., Shekarabi M., Wollebo H.S., Bellizzi A., He L., Salkind J., Khalili K. Inhibition of HSV-1 replication by gene editing strategy // *Sci. Rep*. 2016. Vol. 6. P. 23146.
5. Xu X., Fan S., Zhou J., Zhang Y., Che Y., Cai H. et al. The mutated tegument protein UL7 attenuates the virulence of herpes simplex virus 1 by reducing the modulation of alpha-4 gene transcription // *Viol. J*. Vol. 13. P. 152.
6. van Diemen F.R., Kruse E.M., Hooykaas M.J., Bruggeling C.E., Schurch A.C., van Ham P.M. et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of herpesviruses limits productive and latent infections // *PLoS Pathogens*. 2016. Vol. 12. P. e1005701.

УДК 557.218 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-16-17

ИНТЕНСИВНЫЙ СИНТЕЗ БЕЛКА С СИГНАЛОМ ЯДЕРНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ СТИМУЛИРУЕТ РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСА В РАСТЕНИИ

Комарова Т.В., Шешукова Е.В., Ершова Н.М., Дорохов Ю.Л.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

119991, Москва, Ленинские горы, д. 1

e-mail: t.v.komarova@gmail.com

При введении в растительную клетку чужеродные белки, содержащие сигнал ядерной локализации, например, бактериальные нуклеомодулины, индуцируют накопление мРНК гена γ -тионина и стимулирует репродукцию цитоплазматических вирусов растений.

Ключевые слова: нуклеомодулин, сигнал ядерной локализации, γ -тионин, вирус табачной мозаики

Повышенная экспрессия чужеродного гена может влиять на функционирование растительных клеток, в том числе, модифицируя ядерно-цитоплазматический транспорт макромолекул [1]. Мы предполагаем, что чужеродные белки, содержащие сигнал ядерной локализации (NLS), такие как бактериальные эффекторные белки, нуклеомодулины, могут препятствовать импорту собственных ядерных белков клетки. В данной работе мы изучали эффект повышенного синтеза в растении химерных белков, содержащих последовательность флуоресцентного белка GFP или RFP и сигнал ядерной локализации разной природы, в качестве миметиков бактериального эффектора. Используя систему временной экспрессии, мы создали условия для суперпродукции искусственных белков, содержащих NLS и направляемых в ядро. По нашему предположению это должно привести к конкуренции с клеточными ядерными белками за факторы ядерного импорта и нарушению ядерно-цитоплазматического транспорта. В результате создаются благоприятные условия для репродукции РНК-содержащих цитоплазматических вирусов растений. В своей работе мы проверили это предположение: используя NLS протимозина α человека (NLS_{spTa}), белка VirE3 *Agrobacterium tumefaciens* (NLS_{virE3}), а также идентифицированного нами NLS нуклеомодулина PopP2 патогенной бактерии *Ralstonia solanacearum* мы показали, что интенсивный синтез искусственных NLS-содержащих белков стимулирует репродукцию вируса табачной мозаики (VTM) и накопление мРНК γ -тионина, который является одним из важных участников реакций растений на биотические стрессы, в том числе на бактериальную инфекцию [2].

Для подтверждения взаимосвязи между репродукцией VTM и индукцией γ -тионина, мы выделили промотор гена γ -тионина (PR γ Thio) и создали кассету экспрессии PR γ Thio:GUS для синтеза β -глюкуронидазы (GUS) в качестве репортерной молекулы в системе временной экспрессии в растении. Хотя конститутивная активность PR γ Thio была намного ниже, чем у традиционно используемого в биотехнологии промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты, она резко возростала, когда в клетке присутствовал GFP, слитый с NLS_{spTa} или NLS_{virE3}. Таким образом, накопление мРНК γ -тионина, вызванное интенсивным синтезом чужеродного ядерного белка в системе временной экспрессии, может быть причиной стимуляции репродукции вирусной РНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-34-20062).

Литература

1. Komarova, T. V., et al. Pol II-directed short RNAs suppress the nuclear export of mRNA // *Plant Mol. Biol.* 2010. Vol. 74. № 6. P. 591-603.
2. Pelegriani P.B., Franco O.L. Plant γ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005. Vol. 37. № 11. P. 2239-2253.

UDC 557.218 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-16-17

THE NUCLEAR LOCALIZATION SEQUENCE OF A MASSIVELY SYNTHESIZED PROTEIN DRAMATICALLY INCREASES PLANT VIRUS REPRODUCTION

Komarova T.V., Sheshukova E.V., Ershova N.M, and Dorokhov Y.L.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
Leninskie Gory, 1, Moscow 119991, Russia
e-mail: t.v.komarova@gmail.com

Superproduction of the foreign proteins containing a nuclear localization signal, for example, bacterial nucleomodulins, in the plant cell induces the accumulation of mRNA of the γ -thionin gene and stimulates the reproduction of plant cytoplasmic viruses.

Key words: nucleomodulin, nuclear localization signal, γ -thionin, tobacco mosaic virus

Increased expression of a foreign gene can affect the functioning of plant cells modifying the nucleocytoplasmic transport of macromolecules [1]. We hypothesize that introduced foreign nuclear-localized proteins, such as bacterial nucleomodulins or effectors, can interfere with the import of cellular nuclear proteins. In this work, we studied the effect of increased synthesis in plants of chimeric proteins containing a sequence of GFP or RFP fluorescent proteins and a nuclear localization signal of different nature, as mimetics of the bacterial effector. Using a transient expression system, we created conditions for the superproduction of artificial NLS-containing proteins. According to our assumption, this should lead to competition with cellular nuclear proteins for the factors of nuclear import and interference with the nucleocytoplasmic transport. As a result, favorable conditions for the reproduction of RNA-containing plant cytoplasmic viruses are expected to be created. In our work, we tested this assumption: using the NLS of human prothymosin α (NLS_{pT α}), the VirE3 protein of *Agrobacterium tumefaciens* (NLS_{VirE3}), as well as the identified NLS of PopP2 nucleomodulin of the pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*, we showed that the intensive synthesis of artificial NLS-containing proteins promotes the reproduction of tobacco mosaic virus (TMV) and the accumulation of mRNA encoding γ -thionin, which is one of the important participants in plant responses to biotic stresses, including bacterial infection [2].

To confirm the relationship between TMV reproduction and γ -thionin induction, we isolated the γ -thionin gene promoter (PR γ Thio) and created an expression cassette PR γ Thio:GUS for β -glucuronidase (GUS) as a reporter molecule in the transient expression system in the plant. Although the constitutive activity of PR γ Thio was much lower than that of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter traditionally used in biotechnology, it increased dramatically when GFP fused with NLS_{pT α} or NLS_{VirE3} produced in the cell. Thus, the accumulation of γ -thionin mRNA caused by intensive synthesis of a foreign nuclear protein in the transient expression system may be the cause of the stimulation of viral RNA reproduction.

This study was performed with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (project No. 18-34-20062).

References

1. Komarova, T. V., et al. Pol II-directed short RNAs suppress the nuclear export of mRNA // *Plant Mol. Biol.* 2010. Vol. 74. № 6. P. 591-603.
2. Pelegriani P.B., Franco O.L. Plant γ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005. Vol. 37. № 11. P. 2239-2253.

УДК 616.006.48 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-18-19

КОНСТРУИРОВАНИЕ МЕТОДАМИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ОПУХОЛЬ-СПЕЦИФИЧНЫХ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ТРОПИЗМОМ И УСИЛЕННОЙ ОНКОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Степаненко А.А.^{1,2}, Сосновцева А.О.¹, Чехонин В.П.^{1,2}

¹ ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского" Минздрава России

119034, Москва, пер. Кропоткинский, д. 23

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова

117997, Москва, ул. Островитянова 1

e-mail: a.a.stepanenko@gmail.com

Получена панель репликативно-компетентных опухоль-селективных аденовирусных векторов на основе генома аденовируса 5 с модифицированным тропизмом и увеличенной онколитической активностью для преодоления выраженной внутриопухолевой гетерогенности и химио-/радиотерапевтической резистентности.

Ключевые слова: аденовирус; глиобластома; генная инженерия, онколитическая вирусная терапия.

Мы предложили подход модификации генома аденовируса методом гомологичной рекомбинации в составе бактериальной искусственной хромосомы на основе низкокопийного начала репликации pSC101 (около 5 копий на клетку), что дает преимущества перед баками с однокопийным или среднекопийным началом репликации (p15, около 15-20 копий), а именно возможность работы с небольшими объемами культуры (до 50 мл) и получение "чистых" рекомбинантов без необходимости ретрансформации для разделения родительской и модифицированной плазмиды (относительная быстрота процедуры).

Получены de novo химерные по фибрному протеину аденовекторы Ad5Δ24-RGD-4C, Ad5/3Δ24 и Ad5/35Δ24 с модифицированным тропизмом, взаимодействующие на поверхности клеток глиобластом с различными рецепторами – коксаки и аденовирусным рецептором и интегриновыми комплексами αVβ3 и αVβ5, рецептором десмоглеина 2 и CD46, соответственно. Анализ на панели клеточных линий глиом выявил, что чувствительность опухолевых клеток к аденовекторам с различным тропизмом отличается. Одни линии чувствительны более к Ad5RGD-4C, другие – к Ad5/3, а третьи – к Ad5/35. Различия в чувствительности не объясняются только различиями в уровне экспрессии соответствующих рецепторов на поверхности опухолевых клеток.

Получены рекомбинантные аденовекторы Ad5/3-RGD-4C и Ad5/35-RGD-4C. В отличие от химеры Ad5-RGD-4C присутствие пептида RGD-4C в химере Ad5/3-RGD-4C не влияет или снижает трансдукционный/онколитический потенциал в зависимости от клеточной линии при сравнении с Ad5/3 вектором, тогда как в химере Ad5/35-RGD-4C приводит к значительному снижению трансдукционного/онколитического потенциала при сравнении с Ad5/35 вектором.

Получены рекомбинантные аденовекторы Ad5RGD-4C-I-leader и Ad5RGD-4C-19K, содержащие мутации в С-концах аденовирусных I-leader и gp19K протеинов, соответственно, с повышенной и сопоставимой кинетикой распространения в монослое опухолевых клеток (бляшкообразование) без потери общего уровня репродукции при сравнении с вектором Ad5-RGD-4C. Комбинирование модификаций в векторе Ad5-RGD-4C-I-leader-gp19K приводит к аддитивному усилению кинетики распространения в монослое.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ, №18-29-01009).

Литература

1. Stepanenko A.A., Chekhonin V.P. Recent Advances in Oncolytic Virotherapy and Immunotherapy for Glioblastoma: A Glimmer of Hope in the Search for an Effective Therapy? // *Cancers (Basel)*. 2012. V. 10(12). P. 492.
2. Stepanenko A.A., Chekhonin V.P. A compendium of adenovirus genetic modifications for enhanced replication, oncolysis, and tumor immunosurveillance in cancer therapy // *Gene*. 2018. V. 679. P. 11-18.
3. Stepanenko A.A., Chekhonin V.P. Tropism and transduction of oncolytic adenovirus 5 vectors in cancer therapy: Focus on fiber chimerism and mosaicism, hexon and pIX // *Virus Res*. 2018. V. 257. P. 40-51.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-18-19

THE CONSTRUCTION OF TUMOR-SELECTIVE ADENOVIRAL VECTORS WITH MODIFIED TROPISM AND INCREASED ONCOLYTIC ACTIVITIES USING ADVANCED GENETIC ENGINEERING

Stepanenko A.A.^{1,2}, Sosnovtseva A.O.¹, Chekhonin V.P.^{1,2}.

¹ Department of Fundamental and Applied Neurobiology, V.P. Serbsky National Medical Research Center for Psychiatry and Narcology, The Ministry of Health of the Russian Federation
119034, Moscow, Kropotkinsky lane 23

² Department of Medical Nanobiotechnologies, Medico-Biological Faculty, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, The Ministry of Health of the Russian Federation

117997, Moscow, Ostrovitianov str. 1

e-mail: a.a.stepanenko@gmail.com

A panel of replication competent adenoviral vectors based on the adenovirus 5 genome with high tumor selectivity, modified tropism and increased oncolytic activities to overcome the intratumoral heterogeneity and chemotherapeutic resistance are de novo constructed and characterized *in vitro*.

Key words: adenovirus, genetic engineering, glioblastoma, oncolytic viral therapy.

We have constructed de novo a panel of oncolytic replication-competent tumor-specific adenoviral vectors including fiber chimeric vectors Ad5 Δ 24-RGD-4C, Ad5/3 Δ 24 и Ad5/35 Δ 24, Ad5/3 Δ 24-RGD-4C, and Ad5/35 Δ 24-RGD-4C and compared them on a panel of human and rodent glioma cells. We showed that some glioma cell lines are more sensitive to Ad5-RGD-4C, some to Ad5/3, and others to Ad5/35. Depending on a cell line, Ad5/3-RGD-4C adenovector with the RGD-4C peptide fused to the C-terminus of the chimeric 5/3 fiber had comparable or reduced transduction/cytolytic activity in comparison to parental Ad5/3 vector, whereas Ad5/35-RGD-4C adenovector revealed significantly reduced transduction/cytolytic activity in comparison to Ad5/35. The vectors Ad5-RGD-4C-i-leader and Ad5-RGD-4C-gp19K with mutations in the C-termini of adenoviral i-leader and gp19K proteins, respectively, demonstrated comparable and increased spread and cytolytic effect in the monolayer of tumors cells without loss of a reproduction level, whereas Ad5-RGD-4C-i-leader-gp19K vector combining both mutations demonstrated even a further increase in spread and cytolytic effect.

The work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), Grant No. 18-29-01009

References

1. Stepanenko A.A., Chekhonin V.P. Recent Advances in Oncolytic Virotherapy and Immunotherapy for Glioblastoma: A Glimmer of Hope in the Search for an Effective Therapy? // *Cancers (Basel)*. 2012. V. 10(12). P. 492.
2. Stepanenko A.A., Chekhonin V.P. A compendium of adenovirus genetic modifications for enhanced replication, oncolysis, and tumor immunosurveillance in cancer therapy // *Gene*. 2018. V. 679. P. 11-18.
3. Stepanenko A.A., Chekhonin V.P. Tropism and transduction of oncolytic adenovirus 5 vectors in cancer therapy: Focus on fiber chimerism and mosaicism, hexon and pIX // *Virus Res*. 2018. V. 257. P. 40-51.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

БАКТЕРИОФАГИ В БИОТЕХНОЛОГИИ, СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ И МЕДИЦИНЕ

BACTERIOPHAGES IN BIOTECHNOLOGY, MEDICINE AND AGRICULTURE

Руководитель

В.В. Власов академик РАН, профессор, д.х.н., научный руководитель НИИ химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН /

V. V. Vlasov academician of RAS, director of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Section of RAS

| | |
|---|----|
| 1. РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ОСНОВЕ ЭНДОЛИЗИНОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ РАНЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ А.М.Воробьев, А.В.Алешкин, В.А.Гущин, М.Н.Анурова, Е.О.Бахрушина, И.А.Киселева, Э.Р.Зулькарнеев, А.И.Лаишевцев, О.Г.Ефимова, Э.Р.Мехтиев, Е.О.Рубальский, Л.И.Новикова, С.С.Бочкарева, О.Г.Жиленкова, В.В.Каминский, Н.П.Антонова, Д.В.Васина, А.П.Ткачук..... | 21 |
| DEVELOPMENT OF DOSAGE FORMS WITH ENDOLYSINS FOR THERAPY OF WOUND INFECTIONS A.Vorobev, A.Aleshkin, V.Gushchin, M.Anurova, E.Bakhrushina, I.Kiseleva, E.Zulkarneev, A.Laishetsev, O.Efimova, E.Mekhtiev, E.Rubalskii, L.Novikova, S.Bochkareva, O.ZHilenkova, V.Kaminskii, N.Antonova, D.Vasina, A.Tkachuk..... | 22 |
| 2. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПЕЦИФИЧНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ, ЭКСПОНИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ- АДРЕСУЮЩИЕ ПЕПТИДЫ, С ОПУХОЛЕВЫМИ И ЗДОРОВЫМИ КЛЕТКАМИ МОЗГА Дымова М.А., Войтова А.А., Дмитриева М.Д., Рихтер В.А., Кулигина Е.В. | 23 |
| COMPARATIVE ANALYSIS OF THE BINDING EFFICIENCY OF TUMOR-TARGETING PHAGE PARTICLES INTO CANCER CELLS AND HEALTH BRAIN CELLS Dymova M.A., Voitova A.A., Dmitrieva M.D., Richter V.A., Kuligina E.V. | 24 |
| 3. БАКТЕРИОФАГИ AEROMONAS VERONII И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИ АЭРОМОНОЗЕ КАРПОВ Петров В.А., Вошедский Н.В., Пименов Н.В. | 25 |
| BACTERIOPHAGES OF AEROMONAS VERONII AND THEIR USE IN CARP AEROMONOSIS Petrov V.A., Voshedsky N.V., Pimenov N.V..... | 26 |
| 4. СРАВНЕНИЕ РАДИАЛЬНОЙ ИММУНОДИФУЗИИ И СЭНДВИЧ-ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ТЕЛЯТ Федоров Ю.Н., Ключкина В.И., Богомолова О.А., Романенко М.Н., Царькова К.Н. | 27 |
| COMPARISON OF RADIAL IMMUNODIFFUSION AND SANDWICH-ELISA FOR THE MEASUREMENT IgG IN SERUM OF CALVES, Fedorov Yu.N., Klukina V.I., Bogomolova O.A., Romanenko M.N., Tsar'kova K.N..... | 28 |

УДК: 573.6, ББК: 28.3 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-21-23

РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ОСНОВЕ ЭНДОЛИЗИНОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ РАНЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ

А.М.Воробьев¹, А.В.Алешкин¹, В.А.Гущин², М.Н.Анурова¹, Е.О.Бахрушина³, И.А.Киселева¹,
Э.Р.Зулькарнеев³, А.И.Лаишевцев¹, О.Г.Ефимова¹, Э.Р.Мехтиев¹, Е.О.Рубальский¹, Л.И.Новикова¹,
С.С.Бочкарева¹, О.Г.Жиленкова¹, В.В.Каминский¹, Н.П.Антонова¹, Д.В.Васина¹, А.П.Ткачук¹

¹ ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, Россия, 125212, Москва, Адмирала Макарова, 10, e-mail: info@gabrich.com, 84954521816

² ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Россия, 123098, Москва, Гамалеи, 18, e-mail: k_a@rbcstail.ru, 84991933001

³ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Россия, 119991, Москва, Трубецкая, 8с1, e-mail: rektorat@sechenov.ru, 84992480553

Данная работа посвящена преформуляционным и доклиническим исследованиям новых препаратов эндолизинов в форме геля и спрея, эффективных в отношении раневых инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, в том числе обладающих множественной лекарственной устойчивостью.

Ключевые слова: Бактериофаги, эндолизины, раневая инфекция, бактерицидная активность, доклинические исследования

В настоящее время существует множество способов борьбы с бактериальными инфекциями, среди которых набирает популярность фаготерапия ввиду активности бактериофагов в отношении полирезистентных возбудителей и низкой их токсичности для человека. Несмотря на это, фаготерапия имеет ряд ограничений, таких как узкий спектр литической активности, трудоемкость получения, необходимость культивирования на близких к патогену штаммах, иммуногенность и т. д.

Данным недостатком лишены эндолизины, которые получают биотехнологическим путем с использованием штаммов-продуцентов, несущих плазмиду, участок которой кодирует белок.

В ходе проведенного исследования было доказано, что эндолизины обладают более широким спектром литической активности, нежели бактериофаги. Так, бактериофаг ECD7 способен лизировать только бактерии *E. coli*, в то время, как эндолизин, синтезируемый данным фагом обладает литической активностью в отношении бактерий рода *Salmonella*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter* и т. д. Спектр литической активности был определен также для рекомбинантных эндолизинов бактериофагов Si3, St11, Am24 и Ap22.

Также было доказано, что данные рекомбинантные белки в терапевтических дозах не оказывают токсического эффекта и не влияют на нормофлору.

На основе полученных данных были выбраны белки с наиболее широким спектром литической активности и разработаны две лекарственных формы в виде геля и спрея для применения на раневой поверхности в целях терапии и профилактики раневых инфекций.

Было изготовлено 28 образцов (по 14 образцов для каждой лекарственной формы) и определены их технологические показатели. Для составов с оптимальными показателями определялась стабильность литической активности рекомбинантных эндолизинов в процессе хранения.

В результате были выбраны оптимальные составы, обеспечивающие стабильность белков в течение определенного срока хранения и проведены доклинические испытания на инфекционной модели некробиоза у кроликов. В ходе доклинических исследований была доказана эффективность и безопасность разработанных лекарственных форм. Кроме того, доклинические исследования показали отсутствие гуморального иммунного ответа при применении разработанных препаратов.

Данное исследование открывает новые возможности в терапии раневых инфекций, вызванных полирезистентными возбудителями и позволяет говорить о возможном эффективном применении разработанных препаратов у людей.

Литература

- Antonova N.P., Balabanyan V.Y., Tkachuk A.P., Makarov V.V., Gushchin V.A. Physical and chemical properties of recombinant KPP10 phage lysins and their antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. // *Bulletin of Russian State Medical University*. – 2018. – no. 1. – P. 21-27. doi: 10.24075/brsmu.2018.010.
- Antonova N.P., Vasina D.V., Lendel A.M., Usachev E.V., Makarov V.V., Gintsburg A.L., Tkachuk A.P., Gushchin V.A. Broad bactericidal activity of the Myoviridae bacteriophage lysins LysAm24, LysECD7, and LysSi3 against Gram-negative ESKAPE pathogens. // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11, no. 3. – 284. doi: 10.3390/v11030284.

3. Жаров А. В. Патологическая анатомия животных / Жаров В. А. – М.: КолосС, 2006. – 664 с.
4. МУК 4.2.577-96 Методические указания. Методы контроля биологические и микробиологические факторы. Методы микробиологического контроля продуктов детского и лечебного питания и их компонентов. – Сборник методических документов, необходимых для обеспечения Федерального Закона от 27 октября 2008 г. № 178-ФЗ «Технический регламент на соковую продукцию из фруктов и овощей». – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 84 с.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая. – М.: Гриф и К, 2012 – 536 с. 6 ОСТ 91500.11.0004-2003 // Отраслевой стандарт. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника. – 2003. – URL: www.rspor.ru/db_standarts/PVB_disbacterioz.doc (дата обращения: 27.08.2019).

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-21-23

DEVELOPMENT OF DOSAGE FORMS WITH ENDOLYSINS FOR THERAPY OF WOUND INFECTIONS

A.Vorobev¹, A.Aleshkin¹, V.Gushchin², M.Anurova¹, E.Bakhrushina³, I.Kiseleva¹, E.Zulkarneev¹, A.Laishevtsev¹, O.Efimova¹, E.Mekhtiev¹, E.Rubalskii¹, L.Novikova¹, S.Bochkareva¹, O.Zhilenkova¹, V.Kaminskii¹, N.Antonova³, D.Vasina¹, A.Tkachuk¹

¹ G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Russia, 125212, Moscow, Admiral Makarov, 10

² N.F.Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Russia, 123098, Moscow, Gamalei, 18

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Russia, 119991, Moscow, Trubetskaya, 8 buld. 1

This work is devoted to preformulation and preclinical studies of a new endolysin preparations in the form of gel and spray, effective against wound infections caused by gram-negative bacteria, including those with multidrug resistance.

Key words: Bacteriophages, endolysins, wound infection, bactericidal activity, preclinical studies

Currently, there are many ways to treat bacterial infections, among which phagotherapy is gaining popularity due to the activity of bacteriophages against multiresistant pathogens and their low toxicity to humans. Despite this, phage therapy has a number of limitations, such as a narrow spectrum of lytic activity, the complexity of obtaining, the need for cultivation on pathogen-like strains, immunogenicity, etc.

Endolysins, which are obtained biotechnologically using producer strains carrying a plasmid, a part of which encodes a protein, are devoid of these disadvantages.

In the course of the study, it was proved that endolysins have a wider spectrum of lytic activity than bacteriophages. For example, the ECD7 bacteriophage can lyse only different strains of *E. coli*, while the endolysin synthesized by this phage has lytic activity against bacteria of the genus *Salmonella*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, etc. The lytic activity spectrum was also determined for recombinant endolysins of bacteriophages Si3, St11, Am24 and Ap22.

It was also proved that these recombinant proteins in therapeutic doses do not have a toxic effect and do not affect the normal flora.

Based on the data obtained, proteins with the widest spectrum of lytic activity were selected and two formulations in the form of a gel and a spray were developed for use on the wound surface for the treatment and prevention of wound infections.

28 samples were made (14 samples of each dosage form) and their technological parameters were determined. For formulations with optimal performance, the stability of the lytic activity of recombinant endolysins during storage was determined.

As a result, optimal compositions that ensure the stability of proteins over a certain shelf life were selected and preclinical trials were conducted on rabbit necrobiosis infection model. In the course of preclinical studies, the efficacy and safety of the developed dosage forms was proved. In addition, preclinical studies have shown the absence of a humoral immune response when using the developed drugs.

This study opens up new possibilities in the treatment of wound infections caused by multiresistant pathogens and allows us to talk about the possible effective use of the developed drugs in humans.

References

1. Antonova N.P., Balabanyan V.Y., Tkachuk A.P., Makarov V.V., Gushchin V.A. Physical and chemical properties of recombinant KPP10 phage lysins and their antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. // *Bulletin of Russian State Medical University*. – 2018. – no. 1. – P. 21-27. doi: 10.24075/brsmu.2018.010.

2. Antonova N.P., Vasina D.V., Lendel A.M., Usachev E.V., Makarov V.V., Gintsburg A.L., Tkachuk A.P., Gushchin V.A. Broad bactericidal activity of the Myoviridae bacteriophage lysins LysAm24, LysECD7, and LysSi3 against Gram-negative ESKAPE pathogens. // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11, no. 3. – 284. doi: 10.3390/v11030284.
3. Zharov A.V. *Pathological anatomy of animals* / Zharov V.A. – M.: KolosS Publ., 2006. – 664 p. (in Russian)
4. Guidelines 4.2.577-96. Control methods. biological and microbiological factors. Methods of microbiological control of baby and medical nutrition products and their components. A collection of methodological documents necessary to ensure the Federal Law of October 27, 2008 No. 178 "Technical regulations for fruit and vegetable juice products". – M.: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor Publ., 2010. – 84 p. (in Russian)
5. Guidelines for preclinical studies of drugs (Immunobiological drugs). Part two. – M.: Grif an K Publ., 2012 – 536 p. (in Russian)
6. Industry standard 91500.11.0004-2003 // Patient management protocol. Intestinal dysbiosis. – 2003. – URL: www.rspor.ru/db_standarts/PVB_disbacterioz.doc (date of the application: 27.08.2019). (in Russian)

УДК 616-006.484.03, 616-006.484.04, 577.29 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-23-24

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПЕЦИФИЧНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ, ЭКСПОНИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ-АДРЕСУЮЩИЕ ПЕПТИДЫ, С ОПУХОЛЕВЫМИ И ЗДОРОВЫМИ КЛЕТКАМИ МОЗГА

Дымова М.А., Войтова А.А., Дмитриева М.Д., Рихтер В.А., Кулигина Е.В.

Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН, Новосибирск, Россия
630090, Новосибирск, Пр. Ак. Лаврентьева 8
e-mail: maya.a.rot@gmail.com

Проведена оценка специфичности связывания бактериофагов, экспонирующих опухоль-адресующие пептиды, полученные методом фагового дисплея, с клетками глиобластомы человека U-87 MG методами проточной цитометрии и иммуноферментного анализа (ИФА). На основании полученных данных для дальнейших исследований выбраны бактериофаги, экспонирующие опухоль-адресующие пептиды, обеспечивающие наиболее эффективное связывание фаговой частицы с клетками глиобластомы человека U-87 MG *in vitro*.

Ключевые слова: фаговый дисплей, опухоль-адресующие пептиды, глиобластома, проточная цитометрия, иммуноферментный анализ (ИФА).

Несмотря на прогресс в области диагностики и лечения онкологических заболеваний продолжительность жизни пациентов при злокачественных опухолях головного мозга значительно не изменяется. Таким образом, разработка новых подходов к лечению и новых, в частности, таргетных лекарственных средств, остается актуальной задачей. Для увеличения специфичности уже существующих и вновь разрабатываемых лекарственных средств в качестве опухоль-адресующих агентов могут быть использованы короткие пептиды, специфичные к клеткам опухоли. Получение таких пептидов осуществляется с помощью скрининга комбинаторных фаговых пептидных библиотек в системах *in vitro* и *in vivo*.

Ранее в нашей лаборатории с помощью технологии фагового дисплея были получены опухоль-адресующие пептиды к клеткам глиобластомы человека U-87 MG. В данной работе представлен анализ специфичности связывания отобранных пептидов с клетками U-87 MG и с клетками мозга эмбриона человека ДКМ-5.

Специфичность связывания бактериофагов, экспонирующих отобранные пептиды, с клетками глиобластомы человека U-87MG оценивали методом проточной цитометрии. Визуализацию бактериофагов, связавшихся с клетками, проводили с помощью системы первичных и вторичных антител. Согласно полученным результатам опухоль-адресующие пептиды, экспонированные бактериофагами №№ 26, 20, 49, 36 и 19, обеспечивают наибольшую специфичность связывания фаговых частиц с опухолевыми клетками U-87MG и являются наиболее перспективными для дальнейшего использования.

Специфичность связывания бактериофагов, экспонирующих опухоль-адресующие пептиды, с клетками глиобластомы человека U-87MG и со здоровыми клетками мозга человека ДКМ-5 оценивали методом ИФА с использованием моноклонального пероксидазного конъюгата HRP/Anti-M13. Статистический анализ полученных данных с использованием двухвыборочного критерия Стьюдента и программы «GraphPad Prism» показал специфическое связывание с клетками U-87 MG бактериофагов №№ 19, 20, 26, 36, 49 [p-value <0,0001], № 92 [p-value=0,0002] и № 83 [p-value = 0,0004]. Наиболее эффективно с клетками U-87 MG связывался бактериофаг № 26, экспонирующий пептид SWTFGVQFALQH. Результаты ИФА коррелируют с результатами цитометрии – опухоль-адресующий пептид, экспонированный бактериофагом №26, обеспечивает специфическое связывание фаговой частицы с клетками U-87 MG. Специфического связывания исследуемых

опухоль-адресующих бактериофагов с клетками мозга эмбриона человека ДКМ-5 не наблюдалось.

На основании данных иммуноферментного анализа и проточной цитометрии для дальнейших исследований были выбраны бактериофаги №№ 19, 20, 26, 36, 49, экспонирующие опухоль-адресующие пептиды, обеспечивающие наиболее эффективное связывание фагов с клетками U-87 MG.

Оценка специфичности связывания бактериофагов, экспонирующих опухоль-адресующие пептиды, с опухолью U-87 MG *in vivo* будет проведена на иммунодефицитных мышах в модели ксенографтов. Опухоль-адресующие пептиды, обеспечивающие специфическое связывание фаговых частиц с клетками и опухолью U-87 MG, будут конъюгированы с ингибиторами Pak1 киназы для оценки таргетных и противоопухолевых свойств полученных соединений.

Данная работа выполняется при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (Грант №19-44-02006).

UDC 616-006.484.03, 616-006.484.04, 577.29 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-23-24

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE BINDING EFFICIENCY OF TUMOR-TARGETING PHAGE PARTICLES INTO CANCER CELLS AND HEALTH BRAIN CELLS

Dymova M.A., Voitova A.A., Dmitrieva M.D., Richter V.A., Kuligina E.V.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia
630090, Novosibirsk, Lavrentieva Av. 8
e-mail: maya.a.rot@gmail.com

The binding efficiency of tumor-targeting phage particles, obtained by phage display, into human glioma cell line U-87 MG and health brain cells was evaluated by flow cytometry and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Based on the obtained data, tumor-targeting phage particles that provide the most efficient binding to human glioma cells U-87 MG *in vitro* are selected for further studies.

Key words: phage display, tumor-addressing peptides, glioblastoma, flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Nevertheless, on progress in the field of diagnostics and the cancer treatment, life expectancy of patients with brain cancer does not change significantly. Thus, the development of new approaches to treatment and new, in particular, targeted therapy, remains an urgent task. To increase the specificity of existing and newly developed drugs, short tumor – targeting peptides could be used as tumor-addressing agents. The obtaining such peptides are carried out by screening combinatorial phage peptide libraries *in vitro* and *in vivo*.

Earlier in our laboratory, using phage display technology, tumor-targeting phage particles to human glioma cell line U-87 MG were obtained. This work presents an analysis of the binding specificity of selected phages to glioma cell line U-87 MG cells and to brain cells of the human embryo (DKM-5).

The binding efficiency of tumor-targeting phage particles to human glioma cells U-87MG was evaluated by flow cytometry. Visualization of bacteriophages, which were bound to cells, was performed using the primary-secondary antibody system. According to the results, tumor-targeting phage particles No. 26, 20, 49, 36 and 19, provided the greatest binding specificity to glioma cell line U-87MG and were the most promising for further use.

The phage binding specificity to glioma cell line U-87MG and healthy human brain cells DKM-5 was evaluated by ELISA using the HRP / Anti-M13 monoclonal peroxidase conjugate. Statistical analysis was done by using the Student's t-test and the GraphPad Prism program. It was showed the specific binding of bacteriophages No. 19, 20, 26, 36, 49 to U-87 MG cells [p-value <0.0001], No. 92 [p -value = 0,0002] and No. 83 [p-value = 0,0004]. Bacteriophage No. 26, with SWTFGVQFALQH peptide, was most efficiently bound to U-87 MG cells. The results of ELISA correlate with the results of flow cytometry - the tumor-targeting bacteriophage No. 26 provides specific binding to U-87 MG cells. Specific binding of the studied tumor-targeting bacteriophages to the brain cells of the human embryo DKM-5 was not observed.

Based on the data of ELISA and Flow cytometry, bacteriophages Nos. 19, 20, 26, 36, 49, with tumor-targeting peptides that provide the most efficient binding of these phages to U-87 MG cells, were selected for further studies.

Assessment of binding specificity of bacteriophages exhibiting tumor-targeting peptides *in vivo* will be carried out using *U87MG tumor xenograft* on immunodeficient mice. Tumor-targeting peptides that provide binding specificity of bacteriophages to cells and the *U-87 MG tumor xenograft* will be conjugated to Pak1 kinase inhibitors to evaluate the targeted and antitumor properties of the resulting compounds.

The present study is supported by the Russian Science Foundation (project № 19-44-02006).

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-25-7

БАКТЕРИОФАГИ AEROMONAS VERONII И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИ АЭРОМОНОЗЕ КАРПОВ

Петров В.А., Вошедский Н.В., Пименов Н.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» Россия, Москва
109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23 стр. 1
e-mail:valera.petrov.97@mail.ru

Получены бактериофаги к *Aeromonas veronii* для борьбы с аэромонозом рыб. Показана видоспецифичность выделенных бактериофагов. Изучены их биологические и физические свойства, урожайность. Проведены первичные исследования лечебно-профилактической эффективности биопрепарата бактериофагов на сеголетках карпов.

Ключевые слова: бактериофаги; аэромонос; *Aeromonas veronii*.

Распространение бактериозов в рыбоводстве и животноводстве, вызванных антибиотикорезистентными микроорганизмами, в настоящее время представляет глобальную проблему [1].

Предполагается, что заболевания, вызванные подвижными аэромонадами у пресноводных рыб, связаны, главным образом, с *Aeromonas hydrophila* [2], тогда как другие виды, вероятно, не учитывались. Нами, при вспышке аэромоноза карповых, от зараженной рыбы были выделены два штамма *Aeromonas veronii*. Изучение биологических свойств возбудителей позволило установить их патогенность и множественную антибиотикорезистентность.

Широкое и бессистемное применение антибиотиков в аквакультуре открывает проблему накопления их остаточных количеств. Действующая система борьбы с аэромонозом также предусматривает летоование прудов, в результате чего приостанавливается использование данных водоемов. При разведении рыбы в крупных водоёмах (лиманы, озёра) летоование невозможно. Поэтому необходимы альтернативные средства и способы ветеринарных мероприятий. Одной из таких альтернатив является использование бактериофагов как на этапах рыбоводства, так и на этапах промышленной переработки рыбной продукции для обеспечения санитарной безопасности.

В связи с этим исследование биологических свойств бактериофагов к актуальным возбудителям аэромоноза и биотехнология получения лекарственных и деконтаминантных средств на их основе представляют научный и практический интерес.

Цель работы: селекция и изучение биологических свойств бактериофагов к *Aeromonas veronii* с целью создания антибактериальной композиции для борьбы с аэромонозом рыб.

В результате проведенной работы из сточных вод водоемов Ростовской области, города Грозный, вод рек Сунжа, Гойтинка, Аргунского канала, смывов с зараженной рыбы (13 проб) были выделены 9 изолятов бактериофагов, используя метод обогащения, описанный Адамсом. Негативные колонии характеризовались зоной полного лизиса до 1,5 мм и зоной умеренного лизиса до 2,5 мм в диаметре. Активность по методу Адамса варьировала от 10^{-3} до 10^{-11} . Активность по Грациа, за исключением Phagum VerA 4, от $4,0 \times 10^3$ до $6,0 \times 10^8$.

Идентификация с помощью масс-спектрометрии (MALDI-TOF) показала, что выделенные штаммы относятся к одному виду – *Aeromonas veronii*. При посеве на хромогенную среду бактерии имели разный рост и, затем, были разделены нами на 2 фаговарианта: *Aeromonas veronii* и *Aeromonas veronii* зелёная, основываясь на специфичности бактериофагов к культуре каждого из них. Так, бактериофаги, литически высокоактивные к одному возбудителю, совершенно не проявляли активность к другому. Специфичность фагов подтвердили в исследованиях с 45 штаммами бактерий разных видов семейств Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Pasteurellaceae, Staphylococcaceae, Streptococcaceae.

В исследованиях установлен способ эффективного накопления бактериофагов культивированием на твердых питательных средах.

При исследовании отобранные изоляты с максимальной активностью соответствовали критериям производственно-контрольных штаммов: обладали высокой урожайностью и выраженными свойствами адсорбции на клетках хозяев. Исследуя цикл одиночного развития бактериофагов, нами отмечен

достаточно короткий латентный период – менее 30 минут, при этом средняя урожайность варьировала от 178 у VerA 4 до 456 фаговых частиц у VerZel 1.

В лабораторных исследованиях на сеголетках карпа при экспериментальном инфицировании установлена активность средства на фаговой основе: отсутствие заболеваемости в опытной группе по сравнению с контролем и выраженное снижение показателей обсемененности воды в аквариуме на фоне фагообработки – снижение общего микробного числа с $1,17 \times 10^5$ до $2,34 \times 10^2$ при соответствующих значениях в аквариуме с контрольной группой – $1,52 \times 10^5$.

Полученные результаты могут быть использованы в биотехнологии средств деконтаминации и лекарственных препаратов ветеринарного применения для борьбы с аэромонозом рыб.

Литература

1. Dodds D.R. Antibiotic resistance: A current epilogue. // *Biochem Pharmacol.* – 2017. – 134. – 139-146.
2. Saurabh Dubey, Kiran Avadhani *Aeromonas hydrophila* OmpW PLGA Nanoparticle Oral Vaccine Shows a Dose-Dependent Protective Immunity in Rohu (*Labeo rohita*) // *Vaccines.* – 2016. – 4(2).

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-25-27

BACTERIOPHAGES OF AEROMONAS VERONII AND THEIR USE IN CARP AEROMONOSIS

Petrov V.A., Voshedsky N.V., Pimenov N.V.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology MVA named after K.I. Skryabina" Russia, Moscow
109472, Moscow, st. Akademika Skryabina, 23
e-mail: valera.petrov.97@mail.ru

Bacteriophages to *Aeromonas veronii* were obtained to combat fish aeromonosis. Species specificity of the isolated bacteriophages was shown. Their biological and physical properties, productivity was studied. Primary studies of the therapeutic and prophylactic effectiveness of a biologic product of bacteriophages on yearlings of carps have been carried out.

Key words: bacteriophages; aeromonosis; *Aeromonas veronii*.

The spread of bacteriosis in fish farming and animal husbandry caused by antibiotic-resistant microorganisms currently poses a global problem [1].

Diseases caused by mobile aeromonas in freshwater fish are thought to be associated mainly with *Aeromonas hydrophila* [2], while other species were probably not taken into account. During the outbreak of carp aeromonosis, we isolated two strains of *Aeromonas veronii* from infected fish. A study of the biological properties of pathogens made it possible to establish their pathogenicity and multiple antibiotic resistance.

The wide and unsystematic use of antibiotics in aquaculture opens the problem of accumulation of their residual amounts. The current system to combat aeromonosis also provides for the estivation of ponds, resulting in the suspended use of these water bodies. When breeding fish in large bodies of water (estuaries, lakes), estivation is impossible. Therefore, alternative means and methods of veterinary measures are necessary. One of these alternatives is the use of bacteriophages both at the stages of fish farming and at the stages of industrial processing of fish products to ensure sanitary safety.

In this regard, the study of the biological properties of bacteriophages to the relevant pathogens of aeromonosis and the biotechnology of obtaining medicines and decontaminants based on them are of scientific and practical interest.

Purpose of work: selection and study of the biological properties of bacteriophages of *Aeromonas veronii* in order to create an antibacterial composition to combat fish aeromonosis.

As a result of the work carried out from the wastewater ponds from the reservoirs of the Rostov Region, the city of Grozny, the waters of the Sunzha, Goitinka, Argun canal, washes with infected fish (13 samples), 9 isolates of bacteriophages were isolated, using the enrichment method described by Adams. Negative colonies were characterized by a zone of complete lysis of up to 1.5 mm and a zone of moderate lysis of up to 2.5 mm in diameter. The activity according to the Adams method ranged from 10^{-3} to 10^{-11} . Grazia activity, with the exception of Phagum VerA 4, from 4.0×10^3 to 6.0×10^8 .

Identification using mass spectrometry (MALDI-TOF) showed that the isolated strains belong to the same

species – *Aeromonas veronii*. When plated on chromogenic medium bacteria, they had different growths and then we divided them into 2 phage-variants: *Aeromonas veronii* and *Aeromonas veronii* green, based on the specificity of the bacteriophages to the culture of each of them. So, bacteriophages, lytically highly active to one pathogen, did not show activity to another at all. The specificity of the phages was confirmed in studies with 45 bacterial strains of different species of the Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Pasteurellaceae, Staphylococcaceae, Streptococcaceae families.

In studies, a method for the effective accumulation of bacteriophages by cultivation on solid nutrient media was established.

During the study, the selected isolates with maximum activity corresponded to the criteria of production control strains: they had high yield and pronounced adsorption properties on the host cells. Studying the cycle of single development of bacteriophages, we noted a rather short latent period - less than 30 minutes, while the average yield varied from 178 in VerA 4 to 456 phage particles in VerZel 1.

In laboratory studies on carp yearlings during experimental infection, the activity of the agent on a phage basis was established: the absence of morbidity in the experimental group compared to control and a pronounced decrease in water contamination in the aquarium during phage treatment - a decrease in the total microbial number from 1.17×10^5 to 2.34×10^2 with the corresponding values in the aquarium with the control group - 1.52×10^5 .

The obtained results can be used in biotechnology means of decontamination and medicinal products of veterinary use to combat fish aeromonosis.

References

1. Saurabh Dubey, Kiran Avadhani *Aeromonas hydrophila* OmpW PLGA Nanoparticle Oral Vaccine Shows a Dose-Dependent Protective Immunity in Rohu (*Labeo rohita*) // *Vaccines*. – 2016. – 4(2).

УДК 619.616-097.3 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-27-28

СРАВНЕНИЕ РАДИАЛЬНОЙ ИММУНОДИФФУЗИИ И СЭНДВИЧ-ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ IGG В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ТЕЛЯТ

Федоров Ю.Н., Клюкина В.И., Богомолова О.А., Романенко М.Н., Царькова К.Н.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности»

141142, Россия, Московская обл., Щелковский р-н, пос. Биокомбината,
e-mail: fun181@mail.ru

Проведена сравнительная оценка метода радиальной иммунодиффузии (РИД) и иммуноферментного метода (сэндвич-ИФА) для количественного определения IgG в сыворотке крови телят. Показана положительная корреляция результатов и более высокая чувствительность сэндвич-ИФА определения концентрации IgG в сыворотке крови для экспресс-диагностики нарушений передачи пассивного иммунитета у телят.

Ключевые слова: иммунохимические методы, иммуноглобулин G (IgG), радиальная иммунодиффузия, ИФА, сыворотка крови, телята

Представлены результаты сравнительной оценки методов определения концентрации IgG в сыворотке крови телят с использованием радиальной иммунодиффузии - РИД («золотой стандарт») и иммуноферментного анализа (ИФА) - «сэндвич»-вариант. Концентрация IgG является хорошим индикатором колострального иммунитета и нарушений передачи пассивного иммунитета у телят. Метод радиальной иммунодиффузии выполнен согласно классическому варианту с использованием некоммерческих реагентов: охарактеризованной моноспецифической антисыворотки к IgG крупного рогатого скота и референсной сыворотки с известным содержанием IgG. РИД рассматривается как референсный тест для определения содержания IgG в сыворотке крови [2]. Метод ИФА выполнен в «сэндвич»-варианте. IgG ELISA - высоко чувствительный двух-ступенчатый тест, основанный на принципе двойных антител: присутствующий IgG в сыворотке крови реагирует с анти-IgG антителами, которые абсорбированы на поверхности полистереновых микротитровальных лунок [1]. Метод радиальной иммунодиффузии и ИФА являются тестами, которые непосредственно определяют концентрацию IgG - основного иммуноглобулина в сыворотке крови. Результаты исследований каждого метода показали положительную корреляцию и что ИФА

является более точным методом определения концентрации IgG в сыворотке крови для экспресс-диагностики нарушений передачи пассивного иммунитета у телят (IgG < 10 мг/мл).

Литература

1. Lee S.H., Jaekal J., Bae C.S., Chung B.H., Yun S.C., Gwak M.J., Noh G.J., Lee D.H. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Single Radial Immunodiffusion, and Indirect Methods for the detection of Failure of Transfer of Passive Immunity in Dairy Calves. // *J. Vet. Intern. Med.* -2008. -v.22. -P.212-218.
2. Mancini G., Carbonara O., Heremans J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. // *Immunochem.* 1965. - N.2. P.235-254.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-27-28

COMPARISON OF RADIAL IMMUNODIFFUSION AND SANDWICH-ELISA FOR THE MEASUREMENT IGG IN SERUM OF CALVES

Fedorov Yu.N., Klukina V.I., Bogomolova O.A., Romanenko M.N., Tsar'kova K.N.

*All-Russian Research and Technological Institute of the Biological Industry
141142, Russia, Moscow Province, Shchelkovskii Region, pos. Biokombinata,
e-mail: fun181@mail.ru*

This investigation compared single radial immunodiffusion (sRID) and sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (sandwich-ELISA) for the detection concentration of IgG in serum of calves. The results from each methods was shown positively correlated and that the ELISA test procedure would give more precise estimates of IgG concentration in serum for express diagnosis of failure of transfer of passive immunity of calves.

Key words: immunochemical methods, immunoglobulin G (IgG), single radial immunodiffusion (sRI), sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (sandwich-ELISA), serum, calf.

The objective of this study was to measure IgG concentration in samples serum of calves using both single radial immunodiffusion-sRID («gold test») and sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and to compare results from each immunochemical method. Serum concentration of IgG is a good indicator colosal immunity and method diagnosis failure of transfer of passive immunity. Single radial immunodiffusion (sRID) was performed according to classical variant using noncommercial reagents: antiserum raised against bovine IgG and reference bovine serum with known content IgG [2]. SRID has been considered the reference method for determination of serum IgG concentration The ELISA method used to quantify calf serum IgG concentration was performed according to classical two-site sandwich-variant (the principle of the double antibody): IgG present in samples react with the anti-IgG antibodies which have been absorbed to the surface of polystyrene microtiter wells [1]. The radial immunodiffusion and the enzyme-linked immunosorbent assay are tests that directly measure IgG concentration. It is the most abundant isotype found in serum. The results from each methods was shown positively correlated and that the ELISA test procedure would give more precise estimates of IgG concentration in serum for express diagnosis of failure of transfer of passive immunity of calves. (IgG < 10 mg/ml).

References

1. Lee S.H., Jaekal J., Bae C.S., Chung B.H., Yun S.C., Gwak M.J., Noh G.J., Lee D.H. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Single Radial Immunodiffusion, and Indirect Methods for the detection of Failure of Transfer of Passive Immunity in Dairy Calves. // *J. Vet. Intern. Med.* -2008. -v.22. -P.212-218.
2. Mancini G., Carbonara O., Heremans J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. // *Immunochem.* 1965. - N.2. P.235-254.

БИОМАТЕРИАЛЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ И ПРОМЫШЛЕННОСТИ

NEW GENERATION BIOMATERIALS FOR MEDICINE AND INDUSTRY

Руководители

О.А. Легонькова д.т.н., зав. отделом перевязочных, шовных и полимерных материалов в хирургии ФГБУ «НМИЦ хирургии им.А.В.Вишневого» Минздрава России/ O. A. Legonkova grand PhD (Technology), head of Laboratory, A.V. Vishnevsky Institute of Surgery FSHE, RF Ministry of Health
М.И. Штильман профессор, д.х.н., профессор, зав кафедрой биоматериалов РХТУ им.Д.И.Менделеева Д. И. / M.I. Shtilman professor, doctor habilitatus (Chemistry), professor, D.I. Mendeleev National University of Chemical Technology

| | |
|---|----|
| 1. ВЫСШИЕ РАСТЕНИЯ КАК ПРОДУЦЕНТЫ БИООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ МЕЧЕНЫХ СТАБИЛЬНЫМИ ИЗОТОПАМИ ДЕЙТЕРИЯ Алешкевич Н. В., Аронова Е. Б. | 32 |
| HIGHER PLANTS AS PRODUCERS OF ORGANIC COMPOUNDS LABELED WITH STABLE DEUTERIUM ISOTOPES Aleshkevich N. V., Aronova, E. B. | 33 |
| 2. ФОТОБИОКОНЪЮГАТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ СИНТЕЗОМ НАНОЧАСТИЦ Ag0 И CdS В ФИКОЭРИТРИНЕ: СВОЙСТВА, ПОЛЕЗНЫЕ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ Бекасова О. Д., Курганов Б. И. | 34 |
| PHOTOBIOCONJUGATES OBTAINED BY SYNTHESIS NANOPARTICLES Ag0 AND CdS IN PHYCOERITHRIN: PROPERTIES USEFUL FOR MEDICINE Bekasova O. D. and Kurganov B. I. | 35 |
| 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОРИЕНТИРОВАННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ФРАГМЕНТА ДИМЕРА БЕЛКА А (А-Z2) Бурцева А. Г, Ищенко А. М., Родин С. В. | 36 |
| DEVELOPMENT OF THE METHOD OF ORIENTED IMMOBILIZATION OF RECOMBINANT FRAGMENT OF PROTEIN A (A-Z2) DIMER A.G. Burtseva, A.M. Ischenko, S.V. Rodin | 37 |
| 4. ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА LACTOBACILLUS BREVIS В УСЛОВИЯХ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЯХ Сидорова Н.А., Васильева А.В. | 38 |
| FEATURES OF KINETICS OF PROBIOTIC STRAIN LACTOBACILLUS BREVIS UNDER IMMOBILIZATION CONDITIONS ON NATURAL AND SYNTHETIC CARRIERS Sidorova N.A., Vasilieva A.V. | 39 |
| 5. УПРАВЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ФЕНИЛАЦЕТОНМОНООКСИГЕНАЗЫ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА ГИБРИДНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ МАГНЕТИТ-ЗОЛОТ, ПОД ДЕЙСТВИЕМ НИЗКОЧАСТОТНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ Веселов М.М., Головин Ю.И., Секундо Ф., Клячко Н.Л. | 40 |
| IMMOBILIZED ONTO HYBRID MAGNETITE-GOLD NANOPARTICLES PHENYLACETONEMONOXYGENASE AND ITS REGULATION UNDER LOW-FREQUENCY MAGNETIC FIELD Veselov M.M., Golovin Yu.I., Secundo F., Klyachko N.L. | 41 |
| 6. ПОТЕНЦИАЛ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИРОДНЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ: СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЯ Волова Т.Г., Киселев Е.Г., Шишацкая Е.И. | 42 |
| POTENTIAL AND PROSPECTS OF NATURAL BIOMATERIALS: SYNTHESIS, PROPERTIES, APPLICATIONS Volova T.G., Kiselev E.G., Shishatskaya E.I. | 43 |
| 7. УТИЛИЗАЦИЯ МОЛОЧНОГО И ЖИВОТНОГО ЖИРА МИКРООРГАНИЗМАМИ-ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ ПРОДУЦЕНТАМИ ЛИПАЗ И ЭСТЕРАЗ Герасимчук А.Л., Ивасенко Д.А., Бухтиярова П. А., Анциферов Д. В., Франк Ю. А. | 44 |
| UTILIZATION OF MILK AND ANIMAL FAT BY MICROORGANISMS –POTENTIAL PRODUCERS OF LIPASES AND ESTERASES Gerasimchuk A.L., Ivassenko D.A., Bukhtiyarova P.A., Antsiferov D.V., Frank Y.A. | 45 |
| 8. РАЗРАБОТКА НАНОСТРУКТУРИРОВАННОГО БИОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ КОМБУСТИОЛОГИИ И.Р.Гильмутдинова, П.С.Еремин, Е.Ю.Костромина, Р.Д.Якупова | 45 |
| DEVELOPMENT OF NANOSTRUCTURED BIOPLASTIC MATERIAL FOR COMBUSTIOLOGY I.Gilmutdinova, P.Eremin, Y.Kostromina, R.Yakupova | 47 |
| 9. МЕХАНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТЕГРАЦИИ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ БИОМАТЕРИАЛОВ НА МОДЕЛИ ДЕФЕКТОВ ЧЕРЕПА КРИТИЧЕСКОГО РАЗМЕРА У МЫШЕЙ Громов А.В., Максимкин А.В., Сенатов Ф.С., Чубрик А.В., Струкова Н.В., Генералова М.С., Кривокубов М.С., Никитин К.Е., Грунина Т.М., Попонина М.С., Лунин В.Г., Карягина А.С. | 48 |

| | |
|---|----|
| MECHANICAL STUDY OF INTEGRATION OF OSTEOPLASTIC BIOMATERIALS ON A MODEL OF CRITICAL-SIZE CRANIAL DEFECTS IN MICE Gromov A.V., Makisimkin A.V., Senatov F.S., Chubrik A.V., Strukova N.V., Generalova M.S., Krivozubov M.S., Nikitin K.E., Orlova P.A., Grunina T.M., Poponova M.S., Lunin V.G., Karyagina A.S. | 49 |
| 10. СИНТЕТИЧЕСКИЕ БИОМАТЕРИАЛЫ ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ХИРУРГИИ С ДОБАВЛЕНИЕМ BMP-2 И ЭРИТРОПОЭТИНА Громов А.В., Сенатов Ф.С., Чубрик А.В., Зимина А.И., Струкова Н.В., Кривоzubов М.С., Генералова М.С., Рязанова А.В., Никитин К.Е., Орлова П.А., Грунина Т.М., Попонова М.С., Лунин В.Г., Карягина А.С. | 50 |
| SYNTHETIC BIOMATERIALS FOR RECONSTRUCTIVE SURGERY WITH THE ADDITION OF BMP-2 AND ERYTHROPOIETIN Gromov A.V., Senatov F.S., Chubrik A.V., Zimina A.I., Strukova N.V., Krivozubov M.S., Generalova M.S., Ryazanova A.V., Nikitin K.E., Orlova P.A., Grunina T.M., Poponova M.S., Lunin V.G., Karyagina A.S. | 51 |
| 11. ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ ТАКСИФОЛИНА В ГЛУБОКОМ ЭВТЕКТИЧЕСКОМ РАСТВОРИТЕЛЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛАККАЗА-МЕДИАТОРНОЙ СИСТЕМЫ Морозова О.В., Хлупова М.Е., Шумакович Г.П., Васильева И.С., Громова Е.В., Зайцева Е.А., Ярополов А.И. | 52 |
| TAXIFOLIN POLYMERIZATION IN DEEP EUTECTIC SOLVENT USING LACCASE-MEDIATOR SYSTEM Morozova O.V., Khlupova M.E., Shumakovich G.P., Vasil'eva I.S., Gromova E.V., Zaitseva E.A. and Yaropolov A.I. | 53 |
| 12. СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ-ПРОДУЦЕНТА МОДИФИЦИРОВАННОГО ИНСУЛИН-ПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 1 Кивилев Е.В., Аронова Е.Б., Базарнова Ю.Г. | 53 |
| CREATION OF CELL CULTURE-PRODUCER OF MODIFIED INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1 Kivilev E.V., Aronova Ek.B., Bazarnova Yu.G. | 54 |
| 13. ПЕРВАЯ ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОГО ПОТЕНЦИАЛА АКТИНОБАКТЕРИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С БАЙКАЛЬСКИМИ ЭНДЕМИЧНЫМИ АМФИПОДАМИ Краснова М.Е., Переляева Е.В., Моргунова М.М., Бельшенко А.Ю., Тимофеев М.А., Аксенов-Грибанов Д.В. | 55 |
| THE FIRST ASSESSMENT OF THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF ACTINOBACTERIA ASSOCIATED WITH BAIKAL ENDEMIC AMPHIPODS Krasnova M.E., Pereliaeva E.V., Morgunova M.M., Belyshenko A.Y., Timofeev M.A., Axenov-Gribanov D.V. | 56 |
| 14. ДЕЙСТВИЕ МЕТАБОЛИТОВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ BACILLUS SUBTILIS НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ Лазарев С.А., Михайлова Н.А. | 57 |
| ACTION OF METABOLITES PROBIOTIC STRAINS BACILLUS SUBTILIS ON THE BIOFILM FORMATION OF OPPORTUNISTIC BACTERIA Lazarev S.A., Mikhaylova N.A. | 58 |
| 15. СТЕРИЛЬНЫЕ ГЕЛИ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА Маклакова И.А. | 59 |
| STERILE GELS BASED ON COLLAGEN Maklakova I.A. | 60 |
| 16. БИОСИНТЕЗ И ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРИМЕНЕНИЯ Миронова Г.Ф., Гисматулина Ю.А., Корчагина А.А., Гладышева Е.К., Будаева В.В. | 61 |
| BIOSYNTHESIS AND FUNCTIONALIZATION OF BACTERIAL NANOCELLULOSE FOR INDUSTRIAL APPLICATIONS Mironova G.F., Gismatulina Yu. A., Korchagina A.A., Gladysheva E.K., Budaeva V.V. | 62 |
| 17. РАЗРАБОТКА КОСТНО-ПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, ИМПРЕГНИРОВАННОГО ПЛАЗМИДОЙ С ГЕНОМ КОСТНОГО МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО БЕЛКА-2 И.А. Недорубова, Т.Б. Бухарова, А.В. Васильев, А.А. Кулаков, Д.В. Гольдштейн | 63 |
| DEVELOPMENT OF OSTEOPLASTIC MATERIAL IMPREGNATED WITH PLASMID ENCODING BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2 I.Nedorubova, T.Bukharova, A.Vasilyev, A.Kulakov, D.Goldstein | 64 |
| 18. ПРИМЕНЕНИЕ МНОГОКОМПОНЕНТНОЙ РЕАКЦИИ УГИ ДЛЯ СИНТЕЗА ЛИПОФИЛЬНЫХ ПОЛИАМИНОВ Ничуговский А.И., Маслов М.А. | 65 |
| APPLICATION OF A MULTICOMPONENT UGI REACTION FOR SYNTHESIS OF LIPOPHILIC POLYAMINES Nichugovskiy A.I., Maslov M.A. | 66 |
| 19. СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИН ГИДРОХЛОРИДА Очиров О.С., Стельмах С.А., Григорьева М.Н., Гаркушева Н.М., Могнонов Д.М., Батоев В.Б. | 67 |
| SYNTHESIS AND STUDY OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF POLYHEXAMETHYLENE GUANIDINE HYDROCHLORIDE DERIVATIVES Ochirov O.S., Stelmakh S.A., Grigor'eva M.N., Garkusheva N.M., Mognonov D.M., Batoev V.B. | 68 |

| | |
|--|----|
| 20. БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ БАЙКАЛЬСКИХ АКТИНОБАКТЕРИЙ ПРИ РОСТЕ НА ОТХОДАХ ЛЕСОПИЛЕНИЯ Переляева Е.В., Краснова М.Е., Моргунова М.М., Бельшенко А.Ю., Тимофеев М.А., Аксенов-Грибанов Д.В..... | 68 |
| BIOSYNTHETIC POTENTIAL OF BAIKAL ACTINOBACTERIA CULTIVATED ON THE WOODWASHING WASTES Pereliaeva E.V., Krasnova M.E., Morgunova M.M., Belyshenko A.Y., Timofeyev M.A., Axenov-Gribanov D.V..... | 70 |
| 21. НОВЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ КОСТНЫЙ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ БЕЛОК-2 (BMP-2): ОСТЕОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ В СОСТАВЕ РАЗЛИЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ Попонova М.С., Громов А.В., Карягина А.С. | 71 |
| NEW RECOMBINANT BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2 (BMP-2): OSTEOGENIC ACTIVITY IN THE COMPOSITION WITH VARIOUS MATERIALS FOR REGENERATIVE MEDICINE Poponova M.S., Gromov A.V., Karyagina A.S. | 72 |
| 22. РАВНОВЕСНЫЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПРОЦЕССА СОРБЦИИ КОКАРБОКСИЛАЗЫ НА СОРБЕНТАХ РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРЫ Пятиизбянцев Т. А., Красовицкая И.А., Котова Н. В. | 73 |
| EQUILIBRIUM AND KINETIC PARAMETERS OF COCARBOXYLASE SORPTION PROCESS ON SORBENTS OF DIFFERENT STRUCTURE Pyatiiizbyantsev T.A., Krasovitskaya I.A., Kotova N.V. | 74 |
| 23. ПОДБОР СУБСТРАТОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАКРОМИЦЕТОВ PLEUROTUS OSTREATUS, PLEUROTUS ERYNGII И GANODERMA LUCIDUM Романенко М.Н., Мирошниченко М.И., Ивасенко Д.А., Анциферов Д.В., Глухова Л.Б., Франк Ю.А..... | 75 |
| SELECTION OF GROWTH SUBSTRATES FOR DEVELOPMENT NEW BIOMATERIALS USING MACROMYCETES PLEUROTUS OSTREATUS, PLEUROTUS ERYNGII AND GANODERMA LUCIDUM Romanenko M.N., Miroshnichenko M.I., Ivashenko D.A., Antsiferov D.V., Glukhova L.B., Frank Y.A. | 76 |
| 24. ЭКЗОСОМЫ МОЛОКА ЛОШАДИ - ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СРЕДСТВА АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ С.Е.Седых, А.Е.Кулешова, Г.А.Невинский..... | 77 |
| HORSE MILK EXOSOMES - PERSCEPTIVE AGENTS FOR TARGET DELIVERY S.Sedykh, A.Kuleshova, G.Nevinsky | 77 |
| 25. ВЛИЯНИЕ АЭРАЦИИ НА СТЕПЕНЬ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ А.Е. Ситникова, Н.А. Шавыркина, В.В. Будаева..... | 78 |
| AERATION EFFECT ON BACTERIAL NANOCELLULOSE DEGREE OF POLYMERIZATION A.E. Sitnikova, N.A. Shavyrkina, V.V. Budaeva..... | 80 |
| 26. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ WAMP ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫХ СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ Слезина М.П., Истомина Е.А., Коростылева Т.В., Щербакoва Л.А., Одиhцова Т.И. | 81 |
| STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF WAMP ANTIMICROBIAL PEPTIDES FOR THE DEVELOPMENT OF NEW ENVIRONMENTALLY FRIENDLY PLANT PROTECTION AGENTS Slezina M.P., Istomina E.A., Korostyleva T.V., Scherbakova L.A., Odintsova T.I..... | 82 |
| 27. ВКЛЮЧЕНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА В БЕЛКОВЫЕ ЧАСТИЦЫ КАТАЛАЗЫ Тагирова М.А., Балабушевич Н.Г., Власова К.Ю., Володькин Д., Головин Ю.И., Клячко Н.Л. | 83 |
| INCLUSION OF MAGNETIC NANOPARTICLES OF MAGNETITE INTO PROTEIN PARTICLES OF CATALASE Tagirova M.A., Balabushevich N.G., Vlasova K.Yu., Volodkin D., Golovin Yu.I., Klyachko N.L..... | 84 |
| 28. ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОЧАСТИЦ ВАТЕРИТА С ИММОБИЛИЗИРОВАННЫМ ФЕРМЕНТОМ – КАТАЛАЗОЙ, МЕТОДОМ СОВМЕСТНОГО СООСЖДЕНИЯ Тагирова М.А., Балабушевич Н.Г., Володькин Д., Еремеев Н.Л., Клячко Н.Л..... | 84 |
| OBTAINING OF VATERITE MICROPARTICLES WITH AN IMMOBILIZED ENZYME – CATALASE BY CO- SYNTHESIS Tagirova M.A., Balabushevich N.G., Volodkin D., Eremeev N.L., Klyachko N.L. | 85 |
| 29. БИОКОРРОЗИЯ ПОЛИГУАНИДИН-СОДЕРЖАЩИХ КОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭТИЛЕНА Тихомиров В.А., Герасин В.А., Сивов Н.А., Журина М.В., Богданов К.И. Плакунов В.К., Акар Каунг Мьинт | 86 |
| BIOCORROSION OF POLYETHYLENE-BASED POLYGUANIDINE-CONTANING COMPOSITE MATERIALS Tikhomirov V.A., Gerasin V.A., Sivov N.A., Zhurina M.V., Bogdanov K.I., Plakunov V.C., Ahkar Kaung Myint..... | 87 |
| 30. ЭЛЕКТРОСПИННИНГ КОЛЛАГЕНОВЫХ МАТРИКСОВ: СТРУКТУРНАЯ СТАБИЛИЗАЦИЯ И МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА Е.М.Трифанова, А.О.Мариянац, В.К.Попов..... | 88 |
| ELECTROSPINING OF COLLAGEN MATRIXES: STRUCTURAL STABILIZATION AND MECHANICAL PROPERTIES E.Trifanova, A.Mariyanats, V.Popov | 89 |

| | |
|---|----|
| 31. УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК E.COLI С ПОМОЩЬЮ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ПРИСУТСТВИИ НИЗКОЧАСТОТНОГО ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ А.Д. Усвалиев, А. Моськин, Н.Д. Дагаев, С.Л. Грибановский, А.О. Жигачев, Д.Ю. Головин, С.А. Легоцкий, М.М. Веселов, К.Ю. Власова, А.В. Лапанькова, К.А. Мирошников, Н.Г. Белогурова, Е.А. Зайцева, А.В. Кабанов, А.Г. Мажуга, Ю.И. Головин, Н.Л. Клячко | 90 |
| INCREASING PERMEABILITY OF OUTER MEMBRANE OF E.COLI UNDER ULTRA-LOW FREQUENCY ALTERNATING MAGNETIC FIELD IN THE PRESENCE OF MAGNETIC NANOPARTICLES A.D. Usvaliev, A.V. Nikitin, N.D. Dagaev, S.L. Gribanovsky, A.O. Ghigachev, D.Y. Golovin, S.A. Legotsky, M.M. Veselov, K.Yu. Vlasova, A.V. Lapankova, K.A. Miroshnikov, N.G. Belogurova, E.A. Zaitseva, A.V. Kabanov, A.G. Majouga, Yu. I. Golovin, N.L. Klyachko..... | 91 |
| 32. СИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИСТИКА БИФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ПЛАТФОРМЫ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТ-ЗОЛОТО ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ Чудосай Ю. В., Ефремова М.В., Захарко М.А., Клячко Н. Л., Абакумов М. А..... | 92 |
| SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF A BIFUNCTIONAL PLATFORM BASED ON MAGNETITE-GOLD NANOPARTICLES FOR THERANOSTICS OF CANCER Chudosai I.V., Efremova M.V., Zakharko M.A., Klyachko N. L., Abakumov M. A. | 93 |
| 33. РАНЕВЫЕ ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ: СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ Шумилова А.А., Шишацкая Е.И. | 94 |
| WOUND DRESSINGS BASED ON BACTERIAL CELLULOSE: PREPARATION, PROPERTIES AND USE Shumilova A.A., Shishatskaya E.I..... | 95 |

УДК 581.143.28 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-32-34

ВЫСШИЕ РАСТЕНИЯ КАК ПРОДУЦЕНТЫ БИООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ МЕЧЕНЫХ СТАБИЛЬНЫМИ ИЗОТОПАМИ ДЕЙТЕРИЯ

Алешкевич Н. В., Аронова Е. Б.

ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия
195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 29
e-mail: aleshkevich.nv@edu.spbstu.ru

Получены результаты, показывающие, что семена некоторых видов высших растений, в частности свеклы (*Beta vulgaris L*) и репы (*Brassica rapa L.*), способны давать высокую всхожесть в средах, содержащих 99.9% оксида дейтерия. Данные виды растений могут использоваться в качестве продуцентов для биосинтетического получения меченых дейтерием органических соединений.

Ключевые слова: высшие растения, всхожесть, оксид дейтерия, органические соединения.

Перспективной задачей научных исследований является поиск новых способов биосинтетического получения органических соединений, содержащих высокие уровни изотопного обогащения для нужд медицинской, пищевой и сельскохозяйственной биотехнологий. В процессе роста на тяжелой воде внутри клетки происходит биосинтез биологически важных органических соединений (белков, аминокислот, нуклеиновых кислот, углеводов, жирных кислот, пигментов), в молекулярной структуре которых атомы водорода полностью замещаются на атомы дейтерия [1]. В качестве одного из методов биосинтетического получения дейтерийной биомассы предлагается использование некоторых видов высших растений, семена которых способны давать всхожесть в тяжелой воде [2]. Мы поставили задачу найти виды высших растений, которые способны прорасти на средах, содержащих высокий процент оксида дейтерия. Целью эксперимента было определение всхожести в средах с различным содержанием дейтерия семян высших растений, относящихся к семействам: Fabaceae, Poaceae, Chenopodioideae, Umbelliferae, Cruciferae, Asteraceae. В эксперименте использовались семена сои сорта «Сибирячка», люцерны сорта «Вега», ржи озимой сорта «Орловская 9», свеклы одноростковой сорта «Русская односемянная», моркови сорта «Тушон», репы сорта «Петровская 1», эстрагона сорта «Монарх». Семена были разложены для проращивания на фильтрованную бумагу в четыре чашки Петри для каждой культуры (по 50 семян в каждую), содержащие 4 среды: H₂O (контроль), D₂O12%, D₂O50%, D₂O99.9%. Температура проращивания – 23±1%, влажность воздуха – 22±1%. Руководствуясь имеющимся в ГОСТ 12038-84 описанием [3], по всхожести мы получили результаты (указаны в процентах), представленные в таблице 1.

Таблица 1. Определение всхожести семян для каждой из сред

| Культура | Среда | | | |
|----------|----------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
| | H ₂ O (%) | D ₂ O12 (%) | D ₂ O50 (%) | D ₂ O99.9 (%) |
| Соя | 86 | 72 | 82 | 0 |
| Рожь | 60 | 62 | 38 | 6 |
| Свекла | 82 | 74 | 78 | 58 |
| Люцерна | 54 | 46 | 56 | 22 |
| Морковь | 66 | 74 | 52 | 0 |
| Репа | 90 | 80 | 82 | 56 |
| Эстрагон | 28 | 32 | 14 | 10 |

Мы провели сравнение сред, в которых прорастивались культуры, по угловому критерию Фишера (φ^*). Было выявлено, что среды D₂O12% и D₂O50% по всхожести не отличаются от контрольной ($p < 0.01$). Для всех культур, пророщенных в среде D₂O99.9%, было обнаружено статистически значимое отличие. Наибольшую всхожесть показали две культуры – свекла и репа. Таким образом, выявлено, что свекла и репа имеют высокую всхожесть (более 50%) в среде с максимальным содержанием дейтерия и могут быть рассмотрены как продуценты меченых дейтерием органических соединений.

Литература

1. Мосин О. В., Игнатов И. Биологическая адаптация клеток прокариот и эукариот к оксиду дейтерия // Нано-инженерия. – 2015. – № 2. – С. 37–48.
2. Алешкевич Н. В., Аронова Е. Б. Вика посевная (*Vicia sativa* L.) как модельный объект для биосинтетического получения меченых дейтерием органических соединений // Неделя Науки СПбГУ. Институт биомедицинских систем и биотехнологий: материалы научной конференции с международным участием (Санкт-Петербург, 18-23 ноября 2019 г.) – Санкт-Петербург, 2019. – Т. 2. – С. 111–114.
3. ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. – М.: Стандартинформ, 2011.

UDC 581.143.28 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-32-34

HIGHER PLANTS AS PRODUCERS OF ORGANIC COMPOUNDS LABELED WITH STABLE DEUTERIUM ISOTOPES

Aleshkevich N. V., Aronova, E. B.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia
195251, St. Petersburg, Polytechnicheskaya str., 29
e-mail: aleshkevich.nv@edu.spbstu.ru

The results show the seeds of some higher plant species, in particular beet (*Beta vulgaris* L.) and turnip rap (*Brassica rapa* L.), are capable of high germination ability in environments containing 99.9% deuterium oxide. These plant species can be used as producers for the biosynthetic production of deuterium-labeled organic compounds.

Key words: higher plants, germination ability, deuterium oxide, organic compounds.

A promising task of scientific research is searching for new methods of biosynthetic production of organic compounds containing high levels of isotope enrichment for the needs of medical, food and agricultural biotechnologies. The biosynthesis of biologically important organic compounds (proteins, amino acids, nucleic acids, carbohydrates, fatty acids, and pigments) occurs during cell growth in heavy water. In the molecular structure of these compounds, hydrogen atoms are completely replaced by deuterium atoms [1]. It is proposed that utilizing some species of higher plants, whose seeds are able to germinate in heavy water, can be a viable method of biosynthetic production of deuterium biomass [2]. The task was to find species of higher plants that are able to germinate on substrates containing a high percentage of deuterium oxide. The goal of the experiment was to determine the germination ability of higher plants seeds (belonging to the families: Fabaceae, Poaceae, Chenopodioideae, Umbelliferae, Cruciferae, and Asteraceae) with different deuterium content substrates. The seeds of soybean "Sibiryachka", lucerne "Vega", winter rye "Orlovskaya 9", monogerm beet "Russkaya odnosemennaya",

carrot "Tushon", turnip rap "Petrovskaya 1", and tarragon "Monarch" were used. The seeds were placed on filtered paper in four Petri dishes for each culture (50 seeds per Petri dish), containing 4 substrates: H₂O (control), D₂O12%, D₂O50%, D₂O99.9%. Temperature - 23°±1% and humidity - 22±1% remained constant.

Based on the description available in GOST 12038-84 [3], the results obtained for germination ability (indicated as a percentage) are presented in Table 1.

Table 1. Determination of seed germination ability for each substrate

| Plant | Substrate | | | |
|------------|----------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
| | H ₂ O (%) | D ₂ O12 (%) | D ₂ O50 (%) | D ₂ O99.9 (%) |
| Soy | 86 | 72 | 82 | 0 |
| Rye | 60 | 62 | 38 | 6 |
| Beet | 82 | 74 | 78 | 58 |
| Lucerne | 54 | 46 | 56 | 22 |
| Carrot | 66 | 74 | 52 | 0 |
| Turnip rap | 90 | 80 | 82 | 56 |
| Tarragon | 28 | 32 | 14 | 10 |

Comparison of the germination ability of seeds on substrates was made using the Fisher angle conversion (φ^* -Fisher criterion). It was found that substrates D₂O12% and D₂O50% did not differ from the control ($p < 0.01$) by germination ability. Statistically significant difference was found in all crops grown in D₂O99.9% substrate. The highest germination ability was shown by two plants – beet and turnip rap. Thus, it was found, *Beta vulgaris L.* and *Brassica rapa L.* have high germination ability (more than 50%) on substrate with maximum deuterium oxide content and can be considered as viable producers of deuterium-labeled organic compounds.

References

1. Mosin O. V., Ignatov I. *Biologicheskaya adaptatsiya kletok prokariot i eukariot k oksidu deiteriya // Nanoinzheneriya.* – 2015. – № 2. – S. 37–48.
2. Aleshkevich N. V., Aronova E. B. *Vika posevnaya (Vicia sativa L.) kak modelnyj obekt dlya biosinteticheskogo polucheniya mechenyh deiteriem organicheskikh soedinenij // Nedelya Nauki SPBPU. Institut biomeditsinskih sistem i biotekhnologii: materialy nauchnoj konferencii s mezhdunarodnym uchastiem (Sankt-Peterburg, 18-23 noyabrya 2019 g.) – Sankt-Peterburg, 2019. – T. 2. – S. 111–114.*
3. GOST 12038-84. *Semena selskohozyajstvennykh kultur. Metody opredeleniya vshozhesti.* – M. : Standartinform, 2011.

УДК 577.355.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-34-36

ФОТОБИОКОНЪЮГАТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ СИНТЕЗОМ НАНОЧАСТИЦ АГО И СДС В ФИКОЭРИТРИНЕ: СВОЙСТВА, ПОЛЕЗНЫЕ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ

Бекасова О. Д., Курганов Б. И.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Россия
119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, корп. 2
e-mail: bekasova@bk.ru

Получены и охарактеризованы фоточувствительные биоконъюгаты фикоэритрина (PE) с наночастицами Ag⁰ и CdS. Оптические, фотохимические и электрические свойства Ag⁰•PE и CdS•PE свидетельствуют, что они могут быть полезны для применения в мультифункциональных технологиях, при создании интеллектуальных материалов, потенциометрических сенсоров.

Ключевые слова: наночастицы Ag⁰, наночастицы CdS, фикоэритрин, фотобиоконъюгаты, форма, размер, оптические и электрические свойства

Особый интерес для современных нанотехнологий представляют фотобиоконъюгаты, т.е. биоконъюгаты из фотоактивных молекул и наночастиц (НЧ) со свойствами металлов или полупроводников, так как они открывают дополнительные возможности для одновременной диагностики и терапии, для создания

новых оптоэлектронных устройств, электрохимических медицинских биосенсоров. Нами получены два фотобиоконъюгата, представляющие собой фотосинтетический пигмент из красной водоросли *Callithamnion rubosum* – фикоэритрин (PE) в форме гексамера, содержащий в туннельной полости НЧ Ag⁰ или НЧ CdS соответственно. К достоинствам фикоэритрина, как матрицы для синтеза НЧ, относятся наличие идентичных наноканалов размером 3.5х6 нм в центре молекул, растворимость в воде, отсутствие токсичности. Фикоэритрин интенсивно флуоресцирует ($\lambda_{\text{max}}=578$ нм, $\varphi=0.85$, $\tau=2.9$ нс), способен к обратимым фотохимическим реакциям, образованию свободных радикалов и активных форм кислорода. Фикоэритрин применяется в фотодинамической терапии и в качестве флуоресцентной метки в цитометрии, гистохимии, иммуноанализе.

Биоконъюгат Ag⁰•PE получали при смешивании водных растворов фикоэритрина и AgNO₃ без экзогенного восстановителя. Нулевая валентность серебра подтверждена наличием полосы излучения Ag⁰ (E = 2.98 keV) в энергодисперсионном спектре рентгеновского характеристического излучения. В свежеприготовленном биоконъюгате Ag⁰•PE доминируют НЧ размером 6.2х3.5±0.5х0.1 нм, т.е. совпадающие с размером туннельной полости фикоэритрина. Интенсивность флуоресценции НЧ Ag⁰ в фикоэритрине на порядок выше, чем в других матрицах. Ag⁰•PE выдерживает нагревание до 90 °С. НЧ Ag⁰ усиливают электропроводность фикоэритрина на постоянном токе с 5х10⁻¹⁴ до 2.5х10⁻¹¹ См/см. В переменных полях на низких частотах электропроводность и потери увеличиваются более чем в 200 раз, а диэлектрическая проницаемость повышается в 40 раз при заполнении наноканала фикоэритрина НЧ Ag⁰. Электрические свойства Ag⁰•PE сопоставимы с таковыми для проводящих композитов из полимеров с металлическими нанопроволоками.

Получение фотобиоконъюгата CdS•PE включает: 1) образование комплекса Cd/PE при смешивании водных растворов фикоэритрина и Cd(NO₃)₂; 2) синтез НЧ CdS путем добавления Na₂S к комплексу Cd/PE с последующими центрифугированием и гель-фильтрацией. Фикоэритрин связывает от 20 до 4000 ионов Cd²⁺ в зависимости от исходной концентрации кадмия и при этом остается растворимым в воде. Способность фикоэритрина связывать большое количество ионов Cd²⁺ может облегчить получение оптимальных терапевтических концентраций кадмия в тканях опухолей.

Локализация НЧ CdS в туннельных полостях фикоэритрина доказана при помощи капиллярного электрофореза и аналитического центрифугирования. Размер НЧ CdS совпадает с размером туннельной полости фикоэритрина. Биоконъюгат CdS•PE стабилен и интенсивно флуоресцирует, τ одиночных CdS•PE в воде, составляет 1.9 нс, а у CdS•PE, иммобилизованных на стекле, $\tau=3.4$ нс, тогда как у одиночных Ag⁰•PE $\tau= 2.8$ нс в воде и 2.4 нс на стекле. НЧ CdS, подобно НЧ Ag⁰, подавляют диссоциацию фикоэритрина и повышают его устойчивость к тепловой агрегации. Фотовольтаический эффект CdS•PE имеет такую же величину, как композит из НЧ CdS подобных размеров на поверхности одномерной углеродной нанотрубки. Биоконъюгаты CdS•PE и Ag⁰•PE могут быть использованы для интеграции оптических технологий с электроникой.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-34-36

PHOTOBIOCONJUGATES OBTAINED BY SYNTHESIS NANOPARTICLES AG⁰ AND CDS IN PHYCOERITHRIN: PROPERTIES USEFUL FOR MEDICINE

Bekasova O. D. and Kurganov B. I.

*Bach Institute of Biochemistry, Fundamentals of Biotechnology Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
Leninskii pr. 33, Moscow, 119071 Russia; e-mail: bekasova@bk.ru*

New photosensitive bioconjugates of phycoerythrin (PE) with Ag⁰ and CdS nanoparticles have been obtained and characterized. Optical, photochemical and electrical properties of Ag⁰•PE and CdS•PE can be useful for their applications in multifunctional technologies, at creating intellect materials, potentiometric sensors controlled by light, etc.

Key words: Ag⁰ nanoparticles, CdS nanoparticles, phycoerythrin, photobioconjugates, shape, size, optical and electrical properties

Photobioconjugates, i.e. bioconjugates of photoactive molecules and nanoparticles (NP) with the properties of metals or semiconductors are of special interest for modern nanotechnologies, as they open up additional opportunities for theranostics, expand possibilities in development of new optoelectronic devices and electrochemical medical biosensors. We obtained two photobioconjugates, which are a photosynthetic pigment

from *Callithamnion rubosum* red algae, phycoerythrin (PE), in the hexameric form containing Ag⁰ NP or CdS NP in the tunnel cavity, respectively. The advantages of phycoerythrin as a matrix for the synthesis of NPs include the presence of identical nanochannels with a size of 3.5 x 6 nm in the center of the molecules, solubility in water, and the non-toxicity. Phycoerythrin intensively fluoresces ($\lambda_{\max}=578\text{nm}$, $\phi=0.85$, $\tau=2.9$ ns) and is capable of reversible photochemical reactions, the formation of free radicals and reactive oxygen species, and the generation of negative electrochemical potential under illumination. Phycoerythrin is used in photodynamic therapy and as a fluorescent label in cytometry, histochemistry, and immunoanalysis.

Ag⁰•PE bioconjugate was produced by mixing aqueous solutions of phycoerythrin and AgNO₃ without an exogenous reducing agent. The zero valence of silver is confirmed by the fact that the energy-dispersive characteristic X-ray spectrum of the sample contains a band corresponding to the emission peak of Ag⁰ (E = 2.98 keV). In a freshly prepared Ag⁰•PE bioconjugate, the size of NP of 6.2x3.5 ± 0.5x0.1 nm was dominate, being commensurate to the size of phycoerythrin tunnel cavity. The fluorescence intensity of Ag⁰ NPs in phycoerythrin is an order of magnitude higher than in other matrices. Ag⁰•PE withstands heating to 90 °C. Ag⁰ NPs enhance the DC conductivity of phycoerythrin from 5x10⁻¹⁴ to 2.5x10⁻¹¹ S/cm. In alternating fields at low frequencies, the electrical conductivity and dielectric losses increase by more than 200 times, and the dielectric permittivity increases by 40 times at filling the channel of phycoerythrin with Ag⁰ NP. The electrical properties of Ag⁰•PE are comparable to those of conductive polymer composites that contain metallic nanowires.

Formation of a CdS•PE photobioconjugate includes: 1) obtaining a Cd/PE complex by mixing aqueous solutions of phycoerythrin and Cd(NO₃)₂; 2) synthesis of CdS NPs by adding Na₂S to the Cd/PE complex, followed by centrifugation and gelfiltration. The phycoerythrin molecule as a hexamer binds from 20 to 4000 Cd²⁺ ions, depending on the initial concentration of cadmium in the solution, while remaining soluble in water. The simplicity of the preparation and the stability of the Cd/PE make it possible to use this complex for photodynamic therapy of tumors. The ability of phycoerythrin to bind a large number of Cd²⁺ ions can facilitate the easier obtainment of optimal therapeutic concentrations of cadmium in cancer tissues.

The localization of CdS NPs in tunnel cavities of phycoerythrin has been proven by capillary electrophoresis and analytical centrifugation. The elemental composition of the NPs is confirmed by the energy-dispersive characteristic X-ray spectrum. The size of CdS NPs coincides with the size of the tunnel cavity of phycoerythrin. The CdS•PE bioconjugate is highly stable and intensively fluoresces. The fluorescence lifetime (τ) of single CdS•PE diffusing in water is 1.9 ns, and $\tau = 3.4$ ns for CdS•PE immobilized on glass, while τ of single Ag⁰•PE is 2.8 ns in water and 2.4 ns on glass. CdS NPs, like Ag⁰ NPs, suppress the dissociation of phycoerythrin and increase its resistance to thermal aggregation. The illumination of the CdS•PE as film formed on the platinum electrode results in the generation a photovoltaic effect of the same magnitude as that of single-walled carbon nanotube/CdS nanocomposite. The bioconjugates CdS•PE and Ag⁰•PE can be used for efficient electron transport and for the transfer of optical excitation, i.e. to integrate optical technology with electronics.

УДК 57.088.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-36-38

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОРИЕНТИРОВАННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ФРАГМЕНТА ДИМЕРА БЕЛКА А (А-Z2)

Бурцева А. Г., Ищенко А. М., Родин С. В.

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

Разработан метод ориентированной иммобилизации модифицированного рекомбинантного белка А-Z2 на сефарозную матрицу. По сравнению с общепринятыми методами иммобилизации разработанный метод позволяет повысить связывающую способность сорбента.

Ключевые слова: аффинная хроматография, Белок А, ориентированная иммобилизация.

Одной из быстро развивающихся областей таргетной терапии в последние годы стало применение терапевтических антител. В результате, значительно возросла потребность в эффективных методах выделения и очистки антител, что может быть достигнуто за счет использования аффинных сорбентов с модифицированными производными Белка А и применения различных способов их иммобилизации на матрицы.

Целью исследования являлась разработка метода ориентированной, ковалентной иммобилизации

белка A-Z₂ на модельную, коммерческую Ni-Сефарозу и изучение влияния плотности иммобилизации лиганда на связывающую способность сорбента.

Рекомбинантный белок A-Z₂ был получен из клеток штамма-продуцента *E.coli* BI21(DE3) в форме Z-фрагмента с тремя щелочеустойчивыми мутациями и представлял собой димер, соединенный посредством одинарного линкера с N-концевым гистидиновым тагом. Очистку белка A-Z₂ проводили с использованием методов металл-хелатной и ионообменной хроматографии. Иммобилизацию белка на матрицу осуществляли в три этапа. На первом этапе проводили активацию Ni-Сефарозы периодатным методом с образованием альдегидных групп. На втором этапе активированную матрицу инкубировали с белком лигандом, для его нековалентного связывания через гистидиновый таг, обеспечивая направленную ориентацию белка A-Z₂ в условиях отсутствия взаимодействия альдегидных групп. На третьем этапе для образования прочной ковалентной связи проводили реакцию восстановительного аминирования альдегидных групп матрицы с ориентированным белком посредством увеличения pH реакционной смеси до величины pH 9-9,5. Прочность связи была подтверждена отсутствием лиганда в элюатах после обработки сорбента буферными растворами в диапазоне pH 2-12.

Было проведено сравнение связывающей способности полученного сорбента с сорбентами, полученными неориентированной иммобилизацией. Связывающая способность устанавливалась после часовой инкубации исследуемых сорбентов с фиксированным количеством рекомбинантного IgG1 человека, который был элюирован для проведения анализов 0,1 М глициновым буферным раствором, pH 3,0.

Было показано, что максимальная емкость ориентированного сорбента достигалась при концентрации белка A-Z₂ 15 мг на 1 мл матрицы. Дальнейшее увеличение количества иммобилизуемого лиганда приводило к заметному снижению емкости из-за уменьшения доступности сайтов связывания для антител на сорбенте. В то же время плотность фиксации белка A-Z₂ при неориентированной фиксации возрастала монотонно, достигая максимального значения 22-23 мг/мл сорбента. При этом IgG-связывающая способность сорбента с ориентированной посадкой превышала емкость сорбента сравнения на 20±2%, демонстрируя преимущество разработанного метода.

UDC 57.088.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-36-38

DEVELOPMENT OF THE METHOD OF ORIENTED IMMOBILIZATION OF RECOMBINANT FRAGMENT OF PROTEIN A (A-Z₂) DIMER

A.G. Burtseva, A.M. Ischenko, S.V. Rodin

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

The method of oriented immobilization of modified recombinant protein A-Z₂ on sepharose matrix has been developed. In comparison with conventional methods of immobilization, the developed method allows to increase binding capacity of a sorbent.

Key words: affinity chromatography, Protein A, oriented immobilization.

In the recent years, the application of therapeutic antibodies has become the one of the fast-moving fields of targeted therapy. As a result, the need of efficient methods of purification antibodies has increased significantly. It can be achieved by using affinity chromatographies with modified derivatives of Protein A and application of different methods of their immobilization on matrix.

The objective of this research is developing a method of oriented, covalent immobilization of protein A-Z₂ on model, commercial Ni-Sepharose and sensitivity analysis of ligand immobilization density on sorbent binding capacity.

Recombinant protein A-Z₂ was produced from cells of a producing strain *E.coli* BI21(DE3) in a form of Z fragment with three alkali-resistant mutation and was a dimer, linked via single linker с N-terminal histidine tag. Protein purification A-Z₂ was carried out with metal-chelate и ion exchange chromatographic methods. Protein immobilization on matrix was carried out in 3 stages. In the first stage, the activation of Ni-Sepharose was carried out with periodate method with aldehyde groups formation. In the second stage, activate matrix was incubated with protein legand for its non-covalent binding through a histidine tag, while ensuring directed orientation of protein A-Z₂ in conditions of the absence of aldehyde groups interactions. In the third stage, to form a strong covalent linkage, the reaction of reductive amination of aldehyde groups of matrix with oriented protein was executed by

increasing pH of reaction mixture to pH 9-9,5. The bonding strength was confirmed by absence of ligand in eluates after a processing of the sorbent by buffering solutions in the range between pH 2-12.

The binding capacity of the sorbent obtained was compared with characteristics of sorbents obtained by unoriented immobilization. Binding capacity was setting after 1 hour of incubation of researched sorbents with fixed quantity of recombinant IgG1 of a human who was eluted for analysis by 0,1M glycine buffering solution, pH 3,0.

It was shown that maximum capacity of oriented sorbent was reached with protein A-Z₂ concentration 15mg on 1mL of matrix. The further increasing of quantity of a immobilized ligand was leading to noticeable reduction of capacity because of decreasing of accessibility of binding sites for antibodies. At the same time, the fixation density of a protein A-Z₂, in conditions of unoriented fixation, was increasing monotonously, reaching maximum 22-23 mg/mL of sorbent. Under this IgG, binding capacity of sorbent with oriented immobilization exceeded capacity of a compared sorbent on 20±2%, that demonstrates the advantage of the developed method.

УДК 579.243 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-38-40

ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА LACTOBACILLUS BREVIS В УСЛОВИЯХ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЯХ

Сидорова Н.А., Васильева А.В.

ФГБОУ ВО Петрозаводский государственный университет
185910, Российская Федерация, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33
e-mail: kennard@inbox.ru

Получены характеристики кинетики роста *Lactobacillus brevis* в условиях иммобилизации на шунгитовом носителе, поливинилпирролидоне и биокерамике. Изучены механизмы адсорбции лактобактерий в присутствии модифицированных форм шунгитовых пород. Эксперимент поставлен в условиях периодического культивирования с использованием персонального биореактора RTS-1 (BioSan).

Ключевые слова: иммобилизация, кинетика, пробиотики, шунгит, поливинилпирролидон, биокерамика

Одно из основных требований к пробиотикам – высокое количество жизнеспособных клеток (до 10⁹ КОЕ/мл), которое напрямую зависит от биомассы микроорганизмов и их ферментативной активности [1]. Увеличить выход биомассы можно путем корректировки факторов роста (например, подбор субстратов, pH, времени инкубации) [2-4], но более перспективным является технология иммобилизации бактериальных клеток, позволяющая в константных условиях поддерживать нужные биотехнологические параметры [11]. Стабилизированная культура устойчива к изменению pH, температуры, состава питательной среды [6–9]. Иммобилизация обеспечивает высокую плотность клеток, что ведет к повышению продуктивности [10]. Есть данные о том, что клетки в иммобилизованном состоянии эффективнее используют субстрат при увеличении скорости ферментации [5, 11].

Для исследования выбраны перспективные носители, соответствующие требованиям (биосовместимость, устойчивость к действию органических растворителей, «мягкие» условия иммобилизации без повреждения клетки продуцента): шунгит (из месторождения Нигозеро, Карелия), биокерамика и нанонити поливинилпирролидона. Для каждого носителя выполнена оценка скорости роста и оптической плотности лактобактерий в периодической культуре. Опыт выполнен с использованием персонального биореактора RTS-1 BioSan с программным обеспечением и функцией контроля роста микроорганизмов в режиме реального времени. Природные носители модифицировали перед иммобилизацией методами механической и термической обработки. Высокомолекулярный поливинилпирролидон смешивали с дистиллированной водой при комнатной температуре из расчета 0,13 г/мл. Затем раствор пропускали через электроспиннер для получения нанонитей. Диаметр нитей составил 200–300 нм.

Установлено, что иммобилизованные на носителях клетки сохраняли пролиферативную функцию как непосредственно после иммобилизации, так и в процессе длительной (до 90 часов) ферментации. В опыте и контроле существенно отличались кинетические характеристики роста клеток, что доказывает возможность использования изученных носителей для увеличения биомассы штамма-продуцента. При этом необходимо учитывать, что даже схожие по физическим свойствам и структуре носители могут оказывать различный эффект на исследуемый микроорганизм – от десинхронизации роста до значительного увеличения скорости роста и оптической плотности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям и инвестиционной компании «РБК».

Литература

1. Simon O. *Micro-organisms as feed additives—probiotics*. University of Alberta; Edmonton, AB, Canada: 2005
2. Brinques G.B., do Carmo Peralba M., Ayub M.A.Z. Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 2010, 37, 205–212. doi 10.1007/s10295-009-0665-1
3. Manzoor A., Qazi J.I., Haq I.U., Mukhtar H., Rasool A. Significantly enhanced biomass production of a novel bio-therapeutic strain *Lactobacillus plantarum* (AS-14) by developing low cost media cultivation strategy. *J. Biol. Eng.* 2017, 11, 17. doi 10.1186/s13036-017-0059-2
4. Othman M., Ariff A.B., Wasoh H., Kapri M.R., Halim M. Strategies for improving production performance of probiotic *Pediococcus acidilactici* viable cell by overcoming lactic acid inhibition. doi 10.1186/s13568-017-0519-6
5. Kourkoutas Y, Xolias V, Kallis M, Bezirtzoglou E, Kanellaki M. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. *Process Biochemistry*. 2005, 40(1), 411–416.
6. Saucier L, Champagne C. Immobilised-cell technology and meat processing. In: Nedovic V, Willaert R, editors. *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology*. 2005, 337–353.
7. Heidebach T, Först P, Kulozik U. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*. 2009, 23(7), 1670–1677.
8. Heidebach T, Först P, Kulozik U. Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *International Dairy Journal*. 2009, 19(2), 77–84.
9. Doherty SB, Gee VL, Ross RP, Stanton C, Fitzgerald GF, Brodtkorb A. Efficacy of whey protein gel networks as potential viability-enhancing scaffolds for cell immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Microbiological Methods*. 2010, 80(3), 231–241.
10. Nedovic V, Kalusevic A, Manojlovic V, Levic S, Bugarski B. *Procedia Food Science*. 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications; 1806–1815.
11. Champagne C, Lee B, Saucier L. Immobilization of cells and enzymes for fermented dairy or meat products. In: Zuidam NJ, Nedovic VA, editors. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. 2010, 345–365.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-38-40

FEATURES OF KINETICS OF PROBIOTIC STRAIN LACTOBACILLUS BREVIS UNDER IMMOBILIZATION CONDITIONS ON NATURAL AND SYNTHETIC CARRIERS

Sidorova N.A., Vasilieva A.V.

Petrozavsk State University
185910, Russian Federation, Petrozavodsk, Ave. Lenina, 33
e-mail: kennard@inbox.ru

The growth kinetics of *Lactobacillus brevis* were obtained under conditions of immobilization on a schungite carrier, polyvinylpyrrolidone and bioceramics. The mechanisms of adsorption of lactobacilli in accordance with modified forms of schungite rocks were studied. The experiment was performed under conditions of periodic cultivation using a personal RTS-1 bioreactor (BioSan).

Key words: immobilization, kinetics, probiotics, schungite, polyvinylpyrrolidone, bioceramics

One of the main requirements for probiotics is a high number of viable cells (up to 10^9 CFU/ml), which directly depends on the biomass of microorganisms and their enzymatic activity [1]. It is possible to increase the biomass yield by adjusting growth factors (for example, selection of substrates, pH, incubation time) [2-4], but the technology of immobilization of bacterial cells is more promising, which allows maintaining the necessary biotechnological parameters in constant conditions [11]. A stable culture is resistant to changes in pH, temperature, and the composition of the nutrient medium [6–9]. Immobilization provides a high cell density, which leads to increased productivity [10]. There is evidence that cells in an immobilized state effectively use the substrate with an increase in the fermentation rate [5, 11].

For the study, promising carriers were selected that meet the requirements (biocompatibility, resistance to the action of organic solvents, “mild” immobilization conditions without damaging the producer’s cells): schungite (from the Nigozero deposit, Karelia), bioceramics, and polyvinylpyrrolidone nanofibers. For each carrier, the growth

rate and optical density of lactobacilli in a batch culture were estimated. The experiment was performed using the BioSan RTS-1 personal bioreactor with software and the function of monitoring the growth of microorganisms in real time. Natural carriers are modified prior to immobilization by mechanical and heat treatment methods. High molecular weight polyvinylpyrrolidone mixed with distilled water at a temperature of not more than 0.13 g/ml. Then the solution was passed through an electrospiner to obtain nanofibers. The diameter of the fibers was 200–300 nm.

Fermentation of enzymes is associated with the fact that cells immobilized on carriers retain proliferative function. In the experiments and in the control, there are excellent kinetic characteristics of cell growth, which proves the possibility of using the studied carriers to increase the biomass of the producer strain. All this has a different effect for the studied microorganism - from desynchronization of growth to a significant increase in growth rate and optical density.

This work was financially supported by the Innovation Promotion Fund and the RBC investment company.

УДК 577.15 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-40-41

УПРАВЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ФЕНИЛАЦЕТОНМОНООКСИГЕНАЗЫ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА ГИБРИДНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ МАГНЕТИТ-ЗОЛОТ, ПОД ДЕЙСТВИЕМ НИЗКОЧАСТОТНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ

Веселов М.М., Головин Ю.И., Секундо Ф., Клячко Н.Л.

Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, кафедра химической энзимологии

Тамбовский государственный университет им.Г.Р. Державина, Тамбов, Россия

Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare

Москва, 119991, Ленинские Горы д. 1, стр. 116, Россия, e-mail: veselov.mac@gmail.com

Фенилацетонмонооксигеназа (РАМО) была иммобилизована через полигистидин на Ni-NTA гибридных наночастицах магнетит-золото. В результате иммобилизации фермент практически полностью теряет свою каталитическую активность. Под действием магнитного поля частотой 50 Гц и напряженностью 100 мТл наблюдается увеличение скорости катализируемой ферментом реакции в 1,5 раза в результате «отрыва» РАМО от матрицы.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, низкочастотное магнитное поле, биокатализ, фенилацетонмонооксигеназа (РАМО), иммобилизация ферментов

Фенилацетонмонооксигеназа (РАМО) – фермент из семейства Байера-Вилигера, который катализирует превращение фенилацетона в фенилацетат под действием молекулярного кислорода и NADPH в качестве кофермента. Он состоит из двух доменов – FAD-связывающего и NADPH-связывающего, разделенных крайне консервативным линкером, состоящим из 11 аминокислот (остатки 167-177), называемым «отпечатками пальцев». Ранее было показано [1], что остаток His-173 очень важен для катализа и связывания FAD. Этот остаток полностью экспонирован в растворитель и, по всей видимости, играет важную роль, участвуя во вращении доменов и конформационных изменениях, происходящих в ходе катализа вместе с другими остатками консервативного линкера.

Для эксперимента мы синтезировали гибридные наночастицы магнетит-золото (M-GNP) согласно [2]. Поверхность золота была затем функционализирована нитрилтриуксусной кислотой (NTA), которая образовывала комплекс ионами Ni²⁺. РАМО была иммобилизована на этой матрице (Ni-NTA модифицированные наночастицы) с помощью полигистидиновой (6-His) последовательности. На всех этапах синтеза наночастиц, функционализации их поверхности и иммобилизации фермента был проведен анализ методами просвечивающей электронной микроскопии, динамического светорассеяния и анализа траектории наночастиц.

На последнем этапе нашей работы мы изучили влияние низкочастотного переменного магнитного поля (НЧПМП) частотой 50 Гц и интенсивностью 100 мТл на каталитическую активность иммобилизованной РАМО. В результате иммобилизации активность РАМО снижалась практически до нуля. Ранее было предположено [1], что такое явление обусловлено связыванием остатка His-173 с Ni-NTA модифицированными носителями. Под действием магнитного поля в первые два часа мы не наблюдали ферментативной активности совсем, однако после этого реакция ускорялась. Константа скорости реакции, вычисленная по

полным кинетическим кривым с учетом седиментации наночастиц, возростала в 1,5 раза по сравнению с константой реакции без действия магнитного поля. Мы предполагаем, что под действием гидродинамических сил, возникающих в результате механического вращения наночастиц под действием НЧПМП, происходит частичная десорбция остатка His-173, то есть отрыв (полный или частичный) фермента от матрицы, что переводит фермент в активное состояние.

Эта работа частично поддержана грантами РФФИ 17-54-33027 и 18-29-09154, темой Гос. Регистрации АААА-А16-116052010081-5, Программой развития МГУ

Литература

1. Malito et. all. *Crystal structure of a Baeyer–Villiger monoxygenase*. PNAS, 2004, vol. 101. 36, pp 13157-13162
2. M. Efremova et. all. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8, p. 11295

UDC 577.15 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-40-41

IMMOBILIZED ONTO HYBRID MAGNETITE-GOLD NANOPARTICLES PHENYLACETONEMONOXYGENASE AND ITS REGULATION UNDER LOW-FREQUENCY MAGNETIC FIELD

Veselov M.M., Golovin Yu.I., Secundo F., Klyachko N.L.

Department of Chemical Enzymology, School of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
G.R. Derzhavin Tambov State University, Tambov, Russia
Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare
119991 Moscow, Leninskiye Gory 1-11b, e-mail: veselov.mac@gmail.com

PAMO was immobilized onto Ni-NTA modified hybrid magnetite-gold nanoparticles through polyhistidinemotife. As a result of immobilization, enzyme has become fully inactive. Under the expose to 50 Hz 100 mT magnetic field, catalyzed by enzyme reaction rate increases 1,5 times due to PAMO desorption from nanoparticles.

Key words: magnetic nanoparticles, low-frequency magnetic field, biocatalysis, enzyme immobilization

Phenylacetone monoxygenase (PAMO) is an enzyme of Baeyer-Villiger family that catalyzes the conversion of phenylacetone to phenylacetate using molecular oxygen and NADPH. It consists of FAD-binding and NADP-binding domains divided by very conserved motif of 11 amino acids called fingerprints (residues 167-177). It was shown [1] that His-173 is very crucial for catalysis and FAD binding. This residue is fully solvent exposed and together with fingerprint motif residues are likely to have a critical role by taking part in the domain rotations and conformational changes that occur during the catalytic cycle.

For experiment, hybrid magnetite-gold nanoparticles (M-GNP) were synthesized according to [2]. Then, gold surface of M-GNP were modified with nitrilotriacetic acid (NTA), which formed complex with Ni²⁺ after that. PAMO was immobilized through polyhistidine (6xHis) sequence binding onto Ni-NTA surface G-MNP. All steps of M-GNP synthesis, surface modification and enzyme immobilization were monitored by NTA method, DLS and TEM micro photos.

On the last step of our work, we studied impact of low-frequency (50 Hz 100 mT) on the catalytic activity of immobilized PAMO. As a result of PAMO immobilization its activity decreases practically to zero. It was supposed previously [1] that this phenomenon is associated with His-173 binding to Ni-NTA modified support. Under the expose to 50 Hz 100 mT magnetic field, it was observed that immobilized enzyme has become fully inactive. However, after magnetic field action the reaction rate was increasing. Reaction rate constant, calculated from full kinetic curves (considering also nanoparticles sedimentation) increases in 1,5 time compared with the constant without LFMF. We supposed, that under the impact of hydrodynamic forces, generated by mechanically rotating nanoparticles in LFMF, desorption of His-173 residue occur, that led to the enzyme in its active state.

This work was supported by RFBR grants 17-54-33027 and 18-29-09154, State Topic АААА-А16-116052010081-5, MSU Program of Development

References

1. Malito et. all. *Crystal structure of a Baeyer–Villiger monoxygenase*. PNAS, 2004, vol. 101. 36, pp 13157-13162
2. M. Efremova et. all. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8 p. 11295

УДК:615.46.015 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-42-44

ПОТЕНЦИАЛ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИРОДНЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ: СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЯ

Волова Т.Г.^{1,2}, Киселев Е.Г.^{1,2}, Шишацкая Е.И.^{1,2}

¹ Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия, пр. Свободный 79

² Институт биофизики СО РАН ФИЦ «КНЦ СО РАН», Красноярск, Россия, Академгородок 50 стр. 50
e-mail: volova45@mail.ru

В докладе представлены результаты по разрушаемым биосовместимым биополимерам микробиологического происхождения - полигидроксиалканоатам, включая синтез, свойства полученных полимерных изделий и результаты медико-биологических исследований

Ключевые слова: разрушаемые биополимеры, полигидроксиалканоаты, биосинтез, свойства, процессинг, полимерные изделия, медико-биологические исследования

Концепция устойчивого развития, являющаяся основополагающей идеей XXI века, предполагает ведение новых форм хозяйствования, которые обеспечат сокращение темпов потребления не возобновляемых ископаемых видов сырья, сохранив их для будущих поколений, более эффективное использование энергоресурсов, переход на новые функциональные и экологически чистые материалы, подлежащие рециклингу, а также освоение принципиально новых средств и технологий для защиты окружающей среды и рационального природопользования.

Разработка и освоение новых экологически чистых материалов, обладающих способностью разрушаться в окружающей среде без образования токсичных продуктов, то есть вписываться в глобальные круговоротные циклы, является одним из высокорейтинговых направлений критических технологий XXI века.

Развитие науки и техники приводит к все более широкому внедрению в практику целевых продуктов, синтезируемых в биотехнологических процессах. Ценным продуктом биотехнологии являются полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот (полигидроксиалканоаты, ПГА), которые обладают спектром полезных свойств, включая биосовместимость и биоразрушаемость. Эти полимеры перспективны в качестве материала и изделий биомедицинского назначения, разрушаемой упаковки пищи и напитков, предметов гигиены и санитарии, изделий и препаратов для коммунального и сельского хозяйства.

Коллектив Сибирского федерального университета и Института биофизики СО РАН Федерального исследовательского центра «КНЦ СО РАН» обладает существенным объемом фундаментальных знаний и опыта, накопленными в результате многолетних исследований в области биотехнологии целевых продуктов и новых биоматериалов, обладает существенным объемом фундаментальных знаний и опыта.

На основе исследования закономерностей роста и метаболизма микроорганизмов созданы биотехнические системы продукции целевых продуктов биосинтеза (белка одноклеточных, аминокислот, биоразрушаемых полимеров); получена фундаментальная основа использования исследуемых микроорганизмов в качестве биорегенеративного звена замкнутых биотехнических систем жизнеобеспечения человека. Разработаны и реализованы технологии синтеза биополимеров различного, в том числе нового и ранее неизвестного химического состава, образованных мономерами с различной длиной С-цепи. Технологии синтеза полимеров масштабированы до уровня уникального для РФ пилотного производства, созданного и функционирующего в Сибирском федеральном университете.

С применением ЯМР высокого разрешения, ЭПР и ИК-спектроскопии, рентгеноструктурного анализа исследованы структура и физико-химические свойства биополимеров, выявлена связь между химическим составом, степенью кристалличности, температурными и молекулярно-массовыми характеристиками синтезированных полимеров.

Исследованы условия процессинга полимерных систем (порошков, растворов, эмульсий, расплавов) для переработки в изделия различной структуры и геометрии (пленки, мембраны, волокна, микрочастицы, 2D и 3D формы, трубки) с применением различных способов – контактного прессования, экструзии, гель-технологией, электроспиннинга, испарения растворителей, микронизации эмульсий, 3D печати. Коллектив развернул медико-биологические исследования пионерных полимерных изделий. Полученные экспериментальные и опытные партии высокотехнологичных изделий биомедицинского назначения исследованы в культурах клеток и на лабораторных животных. Показана эффективность применения изделий из ПГА в качестве шовных волокон, трубчатых эндопротезов для абдоминальной

и сосудистой хирургии, материалов для изготовления имплантатов, опорных носителей для культивирования клеток и др. Отдельные изделия исследованы в клинических условиях [1-2].

Литература

1. Volova T.G., Shishatskaya E.I., Sinskey A.J. *Degradable polymers: Production, properties, applications*. Nova Science Pub. Inc. NY:US, 2013. 380 p.
2. Volova T.G., Vinnik Yu.S., Shishatskaya E.I., Markelova N.M., Zaikov G.E. *Natural-based polymers for biomedical applications*. Appl. Acad. Perss. Canada 2017. 460 p.

UDK:615.46.015 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-42-44

POTENTIAL AND PROSPECTS OF NATURAL BIOMATERIALS: SYNTHESIS, PROPERTIES, APPLICATIONS

Volova T.G.^{1,2}, Kiselev E.G.^{1,2}, Shishatskaya E.I.^{1,2}

¹ Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

² Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS", Krasnoyarsk, Russia
e-mail: volova45@mail.ru

The report presents the results on destructible biocompatible biopolymers of microbiological origin - polyhydroxyalkanoate, including synthesis, properties of the obtained polymer products and the results of biomedical research.

Key words: biodegradable biopolymer, polyhydroxyalkanoates, biosynthesis, properties, processing, polymer products, biomedical research

The concept of sustainable development, which is the fundamental idea of the 21st century, involves introduction of new forms of economic management, which will reduce the consumption of non-renewable sources and preserve them for the future generations, enabling more effective use of energy resources, introduction of new functional and environmentally friendly recyclable materials, and development of fundamentally new tools and technologies for the protection of the environment and efficient environmental management.

Development and use of new, environmentally friendly materials, which will be able to be degraded in the environment without producing toxic compounds, thus joining the global material cycles, is among the priorities for critical technologies of the 21st century.

Scientific and technological advancements lead to wider use of products synthesized in biotechnological processes. Polymers of hydroxy-derived alkanic acids, polyhydroxyalkanoates (PHAs), are valuable products of biotechnology, which have a number of useful properties including biocompatibility and biodegradability. These polymers are promising materials for fabricating biomedical devices, degradable packaging for food and drinks, personal hygiene products, and devices and formulations for municipal engineering and agriculture

The staff of the Siberian Federal University, and of Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS" have sufficient knowledge and experience in biotechnology of products with tailored properties and novel biomaterials which have been accumulated over many years of research. Having studied growth and metabolism of microorganisms, the team constructed biotechnological systems for production of target products of biosynthesis (single-cell protein, amino acids, biodegradable polymers). The proposers developed a fundamental basis for using the microorganisms studied as a bioregenerative component in closed biotechnical human life support systems. The team developed and implemented processes of synthesis of biopolymers with different chemical compositions, including new and previously unknown ones, composed of monomers with different carbon chain length. The processes of polymer synthesis were scaled up to the level of the pilot production facility, the only one in Russia, which is now operating in the Siberian Federal University. Using high-resolution NMR, EPR, IR-spectroscopy, and X-ray structure analysis, the proposers examined the structure and physicochemical properties of biopolymers, showed the relationship between the composition of the synthesized polymers and their degrees of crystallinity, temperature characteristics, and molecular weights. Conditions of processing of polymer systems (powders, solutions, emulsions, melts) into products with different structures and of different shapes (films, fibers, nonwoven membranes, microparticles, 2D and 3D constructs, tubes) were studied by using various techniques: contact pressing, extrusion, gel technologies, electrospinning, solvent evaporation, emulsion micronization, 3D printing. The team conducted biomedical studies of polymeric devices. The experimental and pilot-scale batches of high-tech biomedical devices were tested in cell cultures and

on laboratory animals. The tests showed that the devices from PHA could be effectively used as sutures, tubular stents for abdominal and vascular surgery, materials for making implants, scaffolds for cell cultivation, and another. Individual products were examined in a clinic [1-2].

References

1. Volova T.G., Shishatskaya E.I., Sinskey A.J. *Degradable polymers: Production, properties, applications*. Nova Science Pub. Inc. NY:US, 2013. 380 p.
2. Volova T.G., Vinnik Yu.S., Shishatskaya E.I., Markelova N.M., Zaikov G.E. *Natural-based polymers for biomedical applications*. Appl.Acad.Perss. Canada 2017. 460 p.

УДК 579.66 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-44-45

УТИЛИЗАЦИЯ МОЛОЧНОГО И ЖИВОТНОГО ЖИРА МИКРООРГАНИЗМАМИ-ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ ПРОДУЦЕНТАМИ ЛИПАЗ И ЭСТЕРАЗ

Герасимчук А.Л.^{1,2}, Ивасенко Д.А.^{1,2}, Бухтиярова П.А.², Анциферов Д.В.², Франк Ю.А.¹

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия
634050, Томск, пр. Ленина, д.36

² ООО «ТомБиоТех», Томск, Россия, 634030, Томск, ул. П. Нарановича, 10-152
e-mail: gerasimchuk_ann@mail.ru

Проведен анализ состава жирных кислот в культуральной жидкости полученных из жировых отходов чистых культур липофильных бактерий на средах с разными источниками жира. Показано, что микроорганизмы гидролизуют жиры до свободных жирных кислот.

Ключевые слова: микроорганизмы-продуценты; липиды; жирные кислоты; гидролитические ферменты; липазы; эстеразы

Способность прокариот продуцировать ферменты, гидролизующие жиры – липазы и эстеразы – имеет большой потенциал для использования в биотехнологиях утилизации отходов пищевой, косметической промышленности, для очистки жиросодержащих сточных вод. Для разработки новых биопрепаратов важно получение чистых культур микроорганизмов-липолитиков и их изучение.

Целью работы была оценка липолитической активности микроорганизмов, выделенных в селективных условиях из сточных вод предприятий пищевой промышленности: *Pseudomonas citronellolis* A13, *P. extremaustralis* B11 и *Bacillus subtilis* B34. Методом газовой хроматографии с плазменно-ионизационным детектированием обнаружено увеличение общего содержания свободных жирных кислот после культивирования штаммов на минеральной среде с добавлением животного или молочного жира по сравнению с контрольными образцами, что свидетельствует о гидролизе жиров микроорганизмами.

Показаны значительные отличия в количественном содержании некоторых жирных кислот в культуральной жидкости по сравнению с абиотическим контролем. Отмечено повышенное содержание гексановой, каприловой, альфа-линоленовой кислот в эксперименте с молочным жиром, и цис-10-пентадеценовой и пальмитиновой кислот в эксперименте с животным жиром. В среде с молочным жиром процесс гидролиза жиров был более интенсивным, чем с животным жиром.

Отличия в количественном и качественном составе свободных жирных кислот в культуральной жидкости всех трех штаммов, выращенных в присутствии животного жира, от контрольных образцов, позволяют предположить, что использованные штаммы обладают схожей способностью к биодеструкции животного жира.

Работа выполнена по заданию Министерства науки и высшего образования (проект № 0721-2020-0019) и при поддержке Фонда содействия инновациям (договор № 2575ГС1/41327).

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-44-45

UTILIZATION OF MILK AND ANIMAL FAT BY MICROORGANISMS – POTENTIAL PRODUCERS OF LIPASES AND ESTERASES

Gerasimchuk A.L.^{1,2}, Ivashenko D.A.^{1,2}, Bukhtiyarova P.A.², Antsiferov D.V.², Frank Y.A.¹

¹ National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation, 634050, Tomsk, Lenin Ave, 36

² TomBioTech LLC, Tomsk, Russia, 634030, Tomsk, Naranovicha Str., 10-152

e-mail: gerasimchuk_ann@mail.ru

Analysis of fatty acid composition in liquid culture media after lipophilic bacterial strains cultivation was carried out. Pure cultures were earlier isolated from fat-containing wastes and cultivated on media with diverse fat sources. It was shown that microorganisms hydrolyze animal and milk fats to free fatty acids.

Key words: microorganisms-producers; lipids; fatty acids; hydrolytic enzymes; lipases; esterases

The ability of prokaryotes to produce lipid-hydrolases – lipases and esterases – has great potential for application in biotechnologies of food and cosmetics wastes utilization, and for the treatment of fat-containing wastewaters. Isolation and study of microorganisms-producers in pure cultures are important for development of new biological products.

The aim of the work was to assess of the lipolytic activity of microorganisms isolated from food industry wastewater: *Pseudomonas citronellolis* A13, *P. extremaustralis* B11 and *Bacillus subtilis* B34. The increase of the total amount of free fatty acids after cultivation in a mineral medium with the addition of either animal or milk fat compared to control samples was found by of gas chromatography with plasma-ionizing detection. Fatty acids releasing into culture media indicates fat hydrolysis by microorganisms.

Significant differences in quantitative content of certain fatty acids in culture media compared with abiotic control were detected. High content of hexanoic, caprylic, alpha-linolenic acids was observed in the experiment with milk fat; and cis-10-pentadecenoic and palmitic acids in the experiment with animal fat. The process of microbial lipid hydrolysis was more intense in media with milk fat in compare with animal fat.

Low differences in the quantitative and qualitative composition of free fatty acids between the culture media after cultivation of all three strains in the presence of animal fat and control samples suggest that the strains use similar ways for biodegradation of animal fat.

This work was supported by order of the Ministry of Science and Higher Education (project № 0721-2020-0019) and by The Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises in Science and Technology (contract No. 2575GS1 / 41327).

УДК: 57.085.23, ББК: 51.12 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-45-48

РАЗРАБОТКА НАНОСТРУКТУРИРОВАННОГО БИОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ КОМБУСТИОЛОГИИ

И.Р. Гильмутдинова¹, П.С. Еремин¹, Е.Ю. Костромина¹, Р.Д. Якупова²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 125047, Москва, Новый арбат, 32, e-mail: gilm.ilmira@mail.ru, 89686861979

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Россия, 119991, Москва, Трубецкая, 8, e-mail: gilm.ilmira@mail.ru, 89686861979

Описана методика получения нового биопластического материала на основе коллагена, эластина и гиалуроновой кислоты, а также представлены результаты исследования структуры и свойств биоматериала с целью оценки перспективы его дальнейшего использования в клинической практике. Выявлено отсутствие цитотоксического действия образцов материала на фибробласты кожи человека в культуре. Установлено, что биоматериал способен сохранять свои физические свойства в культуральной среде на протяжении более 10 суток. Благодаря своим физическим свойствам и структуре созданный биоматериал обеспечивает эффективные условия для хорошей пролиферации клеток, что позволяет рассматривать его в качестве перспективного биоматериала для использования в клинической практике.

Ключевые слова: клеточные технологии, тканеинженерные конструкции, биопластический материал, коллаген, фибробласты человека

Лечение ран различной этиологии консервативными методами не всегда приводит к ожидаемым результатам [1]. В связи с этим требуется разработка новых современных раневых покрытий, способствующих более эффективному лечению и регенерации кожных покровов [2]. Важным требованием к созданию биопластических материалов является их адгезивность, пластичность, биосовместимость, максимальная приближенность по фиброархитектонике к тканям организма и биологическая активность, позволяющая достигать определенного фармацевтического эффекта от применения [3,4]. В настоящее время при разработке имплантируемых материалов для восстановительной и заместительной медицины предпочтение отдается полимерам природного происхождения (биополимерам) и их производным [2]. При имплантации они расщепляются на более простые соединения, которые выводятся из организма, либо принимают участие в метаболизме на клеточном уровне. Преимуществом биополимеров является то, что при их деградации не образуются токсичные продукты [6]. Среди таких продуктов особое внимание заслуживают материалы на основе коллагена и гиалуроновой кислоты - главных компонентов внеклеточного матрикса, которые принимают участие в восстановлении поврежденных структур дермы [3,4,7].

Цель настоящей работы заключалась в создании биопластического материала на основе коллагена, эластина и гиалуроновой кислоты и исследовании его структуры и свойств для оценки перспективы дальнейшего использования в клинической практике.

Для изготовления биопластического материала использовали следующие компоненты: коллаген, эластин и гиалуроновая кислота, в пропорции, равной соотношению в дерме взрослого человека: коллаген 70-90%, гиалуроновая кислота 5-26%, эластин 1-25%. Для стабилизации биопленки в жидкой среде материал подвергали фотохимической сшивке. Фотохимическую сшивку осуществляли с помощью источника ультрафиолетового излучения ($\lambda < 230$ нм, расстояние от источника излучения до биоматериала 30 см). В процессе разработки материала подбирали: технологию получения гидрогеля, время воздействия на гидрогель ультрафиолетовым излучением для формирования фотохимической сшивки будущего биоматериала.

Сухие вещества смешивали в пропорции: коллаген – 70 %, гиалуроновая кислота – 20 %, эластин – 10%. Добавляли дистиллированную воду и, с помощью лопастной мешалки с подогревом (37°C), мешали на средней скорости 5 минут. Жидкость разливали по гидрофобным поддонам. Оставляли в ламинарном шкафу под ультрафиолетовым излучением на 6 часов с дальнейшим выдерживанием при комнатной температуре в течение 18 часов.

Полученный биоматериал характеризуется высокой эластичностью и упругостью, что позволяет использовать его на поврежденных участках кожи с неровным рельефом или на подвижных участках. Материал так же обладает высокой пористостью, с диаметром пор 100-200 мкм. Учитывая, что полученный биоматериал может использоваться как скаффолд для культивирования клеточных культур, данная структура может обеспечивать условия для миграции клеток внутрь, а так же однородность условий культивирования клеток и механических свойств основы. Исследование стабильности матрикса в культуральной среде показало, что данный материал способен сохранять свои физические свойства на протяжении более чем 10 суток. По истечении 5-ти суток находящийся в CO₂ инкубаторе биоматериал деградирует на 10 – 15 %. Полная деструкция биоматериала происходит на 3-4 неделю инкубации.

Совместное культивирование биопластического материала с культурой клеток фибробластов человека показало отсутствие какого-либо цитотоксического действия на культуру клеток. После 72 часов инкубации, в культуральной жидкости отсутствовали слущенные клетки, морфологические параметры фибробластов на поверхности пластика не изменялись. При культивировании культуры клеток фибробластов на биоматрице отмечено, что все клетки прикрепились к поверхности в течение 4-6 часов после инкубации. Наличие делящихся клеток было обнаружено уже через 24 часа после прикрепления. Общее количество клеток составило 420 ± 84 клеток на мм³. Через 5 дней количество клеток увеличилось до 751 ± 138 на мм³. Максимальное количество клеток визуализировалось на 10 сутки после прикрепления, и составило 2122 ± 315 на мм³.

Структура и состав разработанного раневого покрытия способствуют эффективной пролиферации клеток, что позволяет рассматривать его как перспективный биоматериал для клинической практики.

Литература

1. K.V. Kotenko, I.I. Eremin, B.B. Moroz et al. Cellular technologies in the treatment of radiation burns: the experience of the FMBC them. A.I. Burnazyan. Cell transplantology and tissue engineering. VII (2012) 97-102.
2. L. I. Kalyuzhnaya, D. A. Zemlyanoy, D. V. Tovpeko, S. V. Chebotarev. Analysis of the world experience of using the umbilical cord biomaterials in tissue engineering and 3d bioprinting. Medicine and Health Organization, 4 (2019) 40-55
3. A.V. Martyukova, M.O. Kurtukova, D.V. Popryga, E.I. Cherevko, A.N. Ivanov. Current issues of matrix development for tissue engineering. Fundamental scientific research: theoretical and practical aspects. 2 (2017) 158-160
4. M.I. Shtilman, Ya.O. Mezhev. Implanted and unimplanted medical and biological polymers, Fibre Chemistry . 48 (2016) 249-252.

5. J.J. Guan, M.S. Sacks, E.J. Beckman, W.R. Wagner. *Synthesis, characterization, and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly(ester-urethane)ureas based on poly(caprolactone) and putrescine. Journal of Biomedical Materials Research* 61 (2002) 493-503.
6. M.I. Shtilman Chapters "Biodegradation" and "Bioactive Systems" In: *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*. Taylor & Francis, 2016, pp. 469-474, 804-816
7. Christopher A. Carruthers, Christopher L. Dearth et al.// *Histologic Characterization of Acellular Dermal Matrices in a Porcine Model of Tissue Expander Breast Reconstruction.// Tissue Eng Part A*. 21 (2015) 35-44

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям (договор №14612ГУ/2019 от 23.07.2019)

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-45-48

DEVELOPMENT OF NANOSTRUCTURED BIOPLASTIC MATERIAL FOR COMBUSTIOLOGY

I. Gilmutdinova¹, P. Eremin¹, Y. Kostromina¹, R. Yakupova²

¹ Federal State Budgetary Institution "National Medical Research Center of Rehabilitation and Balneology" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Russia, 125047, Moscow, New Arbat, 32

² 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), Russia, 119991, Moscow, Trubetskaya, 8

The technique of obtaining a new bioplastic material based on collagen, elastin and hyaluronic acid is described. The results of a study of the biomaterial structure and properties in order to assess the prospects for its further use in clinical practice are presented. Co-culturing of the bioplastic material and human fibroblasts did not reveal any cytotoxic effects on cells in culture. It was shown that the biomaterial samples were able to maintain physical properties in the culture medium for more than 10 days. Due to its physical properties and structure, the use of created biomaterial provides effective conditions for good cell proliferation, which allows us to consider it as a promising biomaterial for use in clinical practice.

Key words: cell technologies, tissue engineering constructions, bioplastic material, collagen, human fibroblasts

Conservative treatment of wounds of various etiologies does not always give the expected results [1]. In this regard, the development of new modern wound dressings is required that contribute to the effective treatment and regeneration of the skin [2]. An important requirement for the creation of bioplastic materials is their adhesiveness, plasticity, biocompatibility, maximum closeness in fibroarchitectonics to body tissues and biological activity, which allows to achieve a certain pharmaceutical effect from the application. In use polymers, metals, inorganic materials, carbon-based materials and composites based on them to obtain bioplastic materials [3,4,5]. Currently, in the development of implantable materials for regenerative medicine, preference is given to polymers of natural origin (biopolymers) and their derivatives [2]. During implantation, they are split into simpler compounds that are excreted from the body, or take part in metabolism at the cellular level. The advantage of biopolymers is that toxic products are not formed during their degradation [6]. Among these products, special attention is paid to materials based on collagen and hyaluronic acid - the main components of the extracellular matrix that are involved in the restoration of damaged structures of the dermis [3,4,7].

The purpose of this work was to create a bioplastic material based on collagen, elastin and hyaluronic acid and to study its structures and properties to assess the prospects for further use in clinical practice.

Production of bioplastic material required the following components: collagen, elastin and hyaluronic acid, used in ratio equal to the ratio in dermis of an adult: 70-90 % of collagen, 5-26 % of hyaluronic acid, 1-25 % of elastin. We treated the material with photochemical crosslinking to stabilize biofilm in liquid medium and to form a nanostructured scaffold. The photochemical crosslinking was done with an ultraviolet light source ($\lambda < 230$ nm, 30 cm distance between UV source and biomaterial). While developing the material, we were also elaborating the technology of hydrogel production and settling the time of hydrogel exposure to UV in order to form the photochemical crosslinking of a future biomaterial.

We mixed dry substances in the following ratio: 70 % of collagen, 20 % of hyaluronic acid, 10 % of elastin. We added distilled water and stirred for 5 minutes at average speed, using heated (37°C) paddle mixer. We poured the

liquid into iron and waterproof trays and left it in a laminar flow unit under UV for 6 hours with further storage at room temperature for 18 hours.

The obtained biomaterial is highly elastic and stretchable. This allows to use it on damaged skin areas with uneven relief or on mobile skin areas. The material is also highly porous, with 100-200 μm pore diameter. Since the obtained material can be used as a scaffold for culturing of cell cultures, this structure is able to provide conditions necessary for migration of cells inside, as well as uniform conditions for culturing of cells and mechanical properties of the structure. Studies of stability of matrix in a culture medium revealed that this material was able to maintain its properties for 10 days and more. After 5 days in CO₂ incubator the biomaterial degrades by 10 – 15 %, on the 3rd - 4th week in incubator it is completely destructed.

Co-culturing of a bioplastic material and cell cultures of human fibroblasts did not reveal any cytotoxic effect on cell cultures. After 72 hours of incubation there were no squamos cells in a culture liquid and no changes in morphological parameters of fibroblasts on the plastic surface. We also noticed that during culturing of fibroblast cells on a biomatrix, all cells attached to the surface within 4-6 hours after incubation. Dividing cells were revealed in 24 hours after attachment. Total number of cells reached 420 \pm 84 cells on mm³. In 5 days the number of cells reached 751 \pm 138 on mm³. The maximum number of cells visualized on the 10th day after attachment and totaled 2122 \pm 315 on mm³.

The structure and composition of the developed wound covering boost efficient proliferation of cells, which allows to consider it as a prospective biomaterial for clinical practice.

References

1. K.V. Kotenko, I.I. Eremin, B.B. Moroz et al. Cellular technologies in the treatment of radiation burns: the experience of the FMBC them. A.I. Burnazyan. Cell transplantology and tissue engineering. VII (2012) 97-102.
2. L. I. Kalyuzhnaya, D. A. Zemlyanoy, D. V. Tovpeko, S. V. Chebotarev. Analysis of the world experience of using the umbilical cord biomaterials in tissue engineering and 3d bioprinting. Medicine and Health Organization, 4 (2019) 40-55
3. A.V. Martyukova, M.O. Kurtukova, D.V. Popryga, E.I. Cherevko, A.N. Ivanov. Current issues of matrix development for tissue engineering. Fundamental scientific research: theoretical and practical aspects. 2 (2017) 158-160
4. M.I. Shtilman, Ya.O. Mezhev. Implanted and unimplanted medical and biological polymers, Fibre Chemistry . 48 (2016) 249-252.
5. J.J. Guan, M.S. Sacks, E.J. Beckman, W.R. Wagner. Synthesis, characterization, and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly(ester-urethane)ureas based on poly(caprolactone) and putrescine. Journal of Biomedical Materials Research 61 (2002) 493-503.
6. M.I. Shtilman Chapters "Biodegradation" and "Bioactive Systems" In: Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials. Taylor & Francis, 2016, pp. 469-474, 804-816
7. Christopher A. Carruthers, Christopher L. Dearth et al.// Histologic Characterization of Acellular Dermal Matrices in a Porcine Model of Tissue Expander Breast Reconstruction.// Tissue Eng Part A. 21 (2015) 35–44

Grant: This work was financially supported by the Innovation Assistance Fund (contract No. 14612GU / 2019 of 07.23.2019)

УДК 616.71-003.93 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-48-50

МЕХАНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТЕГРАЦИИ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ БИОМАТЕРИАЛОВ НА МОДЕЛИ ДЕФЕКТОВ ЧЕРЕПА КРИТИЧЕСКОГО РАЗМЕРА У МЫШЕЙ

Громов А.В., Максимкин А.В., Сенатов Ф.С., Чубрик А.В., Струкова Н.В., Генералова М.С., Кривоzubов М.С., Никитин К.Е., Грунина Т.М., Попонова М.С., Лунин В.Г., Карягина А.С.

ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, г. Москва, РФ
123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.18.
e-mail: alexander.v.gromov@gmail.com

Разработана методика исследования интеграции имплантатов на модели дефектов черепа критического размера с помощью метода выдавливания.

Ключевые слова: остеоинтеграция, метод выдавливания, рекомбинантный костный морфогенетический белок человека 2, эритропоэтин, сверхвысокомолекулярный полиэтилен, полиэфирэфиркетон.

Использование нерезорбируемых материалов в реконструктивной хирургии сопряжено с рядом проблем, связанных с их биосовместимостью и остеоинтеграцией. Биомеханические свойства применяемых материалов должны быть близки свойствам костной ткани, зона интеграции должна быть достаточной для обеспечения прочного соединения, обеспечивающего равномерное распределение нагрузки на восстановленный участок кости. Данная проблема может быть решена путем включения в состав биоматериалов нового поколения биологически активных компонентов, обеспечивающих прорастание костной ткани в имплантат. Наиболее перспективными факторам роста и ремоделирования костной ткани являются костный морфогенетический белок 2 (Bone Morphogenetic Protein 2, BMP-2), а также эритропоэтин (ЭПО), обладающий также ангиогенными свойствами. Разработка методики количественной оценки прочности интеграции применяемых материалов представляет собой актуальную задачу современной регенеративной тканевой инженерии.

В качестве нерезорбируемых носителей в работе были использованы пористые СверхВысокомолекулярный ПолиЭтилен (СВМПЭ) и ПолиЭфирЭфирКетон (ПЭЭК), активированные ГидроксилАпатитом (ГАП) для связывания рекомбинантных BMP-2 и ЭПО. Используемые рекомбинантные белки содержали в своей структуре дополнительные белковые домены, обеспечивающие улучшение растворимости и способность к самопроизвольному связыванию с ГАП.

Исследование остеоинтеграции проводили на модели регенерации дефектов черепа критического размера у мышей. Для этого формировался дефект размером 4 мм, который заполняли имплантатами в виде дисков, выполненных из пористых СВМПЭ/ГАП и ПЭЭК/ГАП с добавлением или без добавления BMP-2 и ЭПО. Через 6 недель после операции проводили микрокомпьютерную томографию, эвтаназию, гистоморфометрию и механическое исследование прочности интеграции. В качестве контроля использовали пустые дефекты, а также черепа мышей с частичным формированием дефекта (погружение трепана не на полную глубину кости).

Тестирование механической интеграции методом выдавливания проводилось с помощью специально разработанной оснастки на универсальной разрывной машине Zwick/Roell Z020 (Германия) со скоростью продавливания пуансоном имплантата в своде черепа мыши 10 мм/мин. При проведении механических испытаний оценивали прочность ткани в месте соединения имплантата со сводом черепа. Перед испытанием каждый образец был заклеен в двухкомпонентный клей на основе эпоксидной смолы. При проведении механических испытаний были измерены разрушающая нагрузка и деформация. Разрушающая нагрузка - это сила необходимая, чтобы выдавить имплантат из свода черепа мыши.

По результатам исследования наилучшими показателями прочности обладали материалы с добавлением обоих факторов, в особенности, на основе СВМПЭ/ГАП. Данный вид материала характеризовался также наибольшим объемом новообразованной кости и наибольшей площадью контакта с материнской костью. Количественные данные, полученные с помощью механических испытаний имели хорошую корреляцию с результатами томографии ($R^2 = 0,77$) и гистоморфометрии ($R^2 = 0,81$).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-00133).

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-48-50

MECHANICAL STUDY OF INTEGRATION OF OSTEOPLASTIC BIOMATERIALS ON A MODEL OF CRITICAL-SIZE CRANIAL DEFECTS IN MICE

Gromov A.V., Makisimkin A.V., Senatov F.S., Chubrik A.V., Strukova N.V., Generalova M.S., Krivozubov M.S., Nikitin K.E., Orlova P.A., Grunina T.M., Poponova M.S., Lunin V.G., Karyagina A.S.

*Gamaleya Research Center for Epidemiology and Microbiology, Russian Federation.
123098, Russian Federation, Moscow, Gamalei Str., 18
e-mail: alexander.v.gromov@gmail.com*

A method for investigating the integration of implants on a model of critical-size cranial defects using push-out method has been developed.

Key words: osseointegration, push-out method, recombinant human bone morphogenetic protein 2, erythropoietin, ultra-high molecular weight polyethylene, polyetheretherketone.

The use of non-resorbed materials in reconstructive surgery is associated with a number of problems related to their biocompatibility and osseointegration. The biomechanical properties of the materials used should be close to the properties of the bone tissue, the integration zone should be sufficient to provide a strong connection that ensures an even distribution of the load on the restored area of the bone. This problem can be solved by including

in the new generation biomaterials the biologically active components that ensure the growth of bone tissue in the implant. The most promising factors for growth and remodeling of bone tissue are bone morphogenetic protein 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2), as well as erythropoietin (EPO), which also has angiogenic properties. The development of methods for quantitative research of the strength of integration of applied materials is an urgent task of modern regenerative tissue engineering.

As non-resorbed carriers, we used porous Ultra-High Molecular Weight PolyEthylene (UHMWPE) and PolyEtherEtherKetone (PEEK) activated by HydroxyApatite (HA) for binding recombinant BMP-2 and EPO. The recombinant proteins used contained additional protein domains in their structure, providing improved solubility and the ability to bind HA spontaneously.

The study of osseointegration was performed on a model of regeneration of critical-size cranial defects in mice. A 4 mm defect was formed and filled with disk-shaped implants made of porous UHMWPE/HA and PEEK/HA with or without the addition of BMP-2 and EPO. 6 weeks after the operation, microcomputer tomography, euthanasia, histomorphometry and mechanical examination of the integration strength were performed. As a control, empty defects were used, as well as the skulls of mice with partial defect formation (the trepan was not submerged to the full depth of the bone).

Testing of mechanical integration by push-out method was carried out using a specially designed tool on a Zwick/Roell Z020 universal tensile testing machine (Germany) with a punching rate of 10 mm/min in the calvarium. During mechanical tests, tissue strength was evaluated at the junction of the implant with the calvarium. Before testing, each sample was sealed in a two-component epoxy-based adhesive. During mechanical tests, the breaking load and deformation were measured. Breaking load is the force necessary to squeeze an implant out of mouse calvarium.

According to the results of the study, materials with the addition of both factors, especially those based on UHMWPE/HA, had the best strength indicators. This type of material was also characterized by a largest volume of newly formed bone, as well as the maximum area of contact with the native bone. Quantitative data obtained by mechanical tests had a good correlation with the results of tomography ($R^2 = 0.77$) and histomorphometry ($R^2 = 0.81$).

This work is supported by the Russian Science Foundation (grant no. 16-15-00133).

УДК 616.71-003.93 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-50-52

СИНТЕТИЧЕСКИЕ БИОМАТЕРИАЛЫ ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ХИРУРГИИ С ДОБАВЛЕНИЕМ ВМР-2 И ЭРИТРОПОЭТИНА

Громов А.В., Сенатов Ф.С., Чубрик А.В., Зимина А.И., Струкова Н.В., Кривоzubов М.С., Генералова М.С., Рязанова А.В., Никитин К.Е., Орлова П.А., Грунина Т.М., Попонова М.С., Лунин В.Г., Карягина А.С.

ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, г.Москва, РФ
123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.18.
e-mail: alexander.v.gromov@gmail.com

Разработаны синтетические материалы на основе сверхвысокомолекулярного полиэтилена (СВМПЭ), полиэфирэфиркетона (ПЭЭК) и полилактида (ПЛА) с добавлением рекомбинантного фактора роста костной ткани ВМР-2 и эритропоэтина, обладающие высокой биосовместимостью и остеоиндуктивными свойствами.

Ключевые слова: рекомбинантный костный морфогенетический белок человека 2, эритропоэтин, сверхвысокомолекулярный полиэтилен, полиэфирэфиркетон, полилактид, остеопластический материал, регенерация костной ткани.

Проблема восстановления целостности и функциональности сегментов опорно-двигательного аппарата является чрезвычайно актуальной. В случае неудачной фиксации, при большом объеме повреждения, а также в пожилом возрасте собственная регенеративная функция кости может оказаться недостаточной, что приводит к неполному сращению, возникновению ложного сустава, повторным переломам или дефекту кости. Одним из путей решения этой проблемы является создание биоматериалов нового поколения с повышенным регенеративным потенциалом, применение которых позволит сократить сроки восстановления костной ткани, уменьшить сроки реабилитации и улучшить качество жизни пациентов. Остеоиндуктивные свойства материала могут быть достигнуты за счет включения в его состав рекомбинантного костного морфогенетического белка 2 (Bone Morphogenetic Protein 2, BMP-2), а также эритропоэтина (ЭПО), обладающего не только ангиогенными свойствами, но также оказывающего положительное влияние на процессы ремоделирования костной ткани. Выбор безопасного носителя, обеспечивающего пролонгированное действие стимуляторов роста костей, является нетривиальной задачей. Синтетическими материалами, обладающими

требуемыми свойствами, являются, в частности, нерезорбируемый сверхвысокомолекулярный полиэтилен (СВМПЭ) и полиэфирэфиркетон (ПЭЭК), а также резорбируемый полилактид (ПЛА).

В нашей работе были использованы пористые вариации СВМПЭ, ПЭЭК и ПЛА, активированные гидроксилапатитом (ГАП), введенным в их структуру в сочетании с BMP-2 и ЭПО с дополнительными белковыми доменами, обеспечивающими улучшение растворимости и способности к самопроизвольному связыванию с ГАП.

Была изучена кинетика выхода рекомбинантных белков с носителей, а также биосовместимость полученных материалов *in vitro* по оценке гемолиза эритроцитов и цитотоксичности, индуцированных изучаемыми материалами с введенными в них белками и без.

Остеоинтеграция и индуктивные свойства *in vivo* были охарактеризованы на модели регенерации краиниальных дефектов критического размера у мышей. Томографию проводили через 0, 3 и 6 недель после операции, эвтаназию и гистоморфометрию - через 42 дня после операции. По результатам томографии и гистологического анализа все имплантированные биокомпозиции продемонстрировали высокую биосовместимость. Добавление BMP-2 к различным биоматериалам приводило к значительному остеогенному эффекту и образованию крупных участков минерализации начиная с 3-недельного срока после операции. Эффект добавления эритропоэтина на новообразование костной ткани был наиболее выраженным в случае имплантатов на основе ПЛА.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-00133).

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-50-52

SYNTHETIC BIOMATERIALS FOR RECONSTRUCTIVE SURGERY WITH THE ADDITION OF BMP-2 AND ERYTHROPOIETIN

Gromov A.V., Senatov F.S., Chubrik A.V., Zimina A.I., Strukova N.V., Krivozubov M.S., Generalova M.S., Ryazanova A.V., Nikitin K.E., Orlova P.A., Grunina T.M., Poponova M.S., Lunin V.G., Karyagina A.S.

Gamaleya Research Center for Epidemiology and Microbiology, Russian Federation.
123098, Russian Federation, Moscow, Gamalei Str., 18
e-mail: alexander.v.gromov@gmail.com

Synthetic materials based on Ultra-High Molecular Weight PolyEthylene (UHMWPE), PolyEtherEtherKetone (PEEK) and PolyLActide (PLA) with the addition of recombinant bone growth factor BMP-2 and erythropoietin have been developed, which have high biocompatibility and osteoinductive properties.

Key words: recombinant human bone morphogenetic protein 2, erythropoietin, ultra-high molecular weight polyethylene, polyetheretherketone, polylactide, osteoplastic material, bone tissue regeneration.

The problem of restoring the integrity and functionality of segments of the musculoskeletal system is extremely urgent. In the case of unsuccessful fixation, with a large amount of damage, as well as in old age, the bone's own regenerative function may be insufficient, which leads to incomplete fusion, the appearance of a false joint, repeated fractures or a bone defect. The solution of this problem could be a development of a new generation of biomaterials with increased regenerative potential, the use of which will reduce the time of bone recovery, reduce the time of rehabilitation and improve the quality of life of patients. Osteoinductive properties of the material can be provided by including in its composition recombinant bone morphogenetic protein 2 (Bone Morphogenetic Protein 2, BMR-2), as well as erythropoietin (EPO), which has not only angiogenic properties, but also has a positive effect on the processes of bone remodeling. Choosing a safe carrier that provides a prolonged effect of bone growth factors is a non-trivial task. Synthetic materials that have the required properties are, in particular, non-resorbable Ultra-High Molecular Weight PolyEthylene (UHMWPE) and PolyEtherEtherKetone (PEEK), as well as resorbable PolyLActide (PLA).

In our work, we used porous variations of UHMWPE, PEEK, and PLA activated by HydroxylApatite (HA) introduced into their structure in combination with BMP-2 and EPO with additional protein domains that provide improved solubility and ability to bind to HA spontaneously.

The release kinetics of recombinant proteins from carriers, as well as the biocompatibility of the obtained materials *in vitro* were studied by assessing the hemolysis of red blood cells and cytotoxicity induced by the studied materials with and without proteins introduced into them.

Osteointegration and osteoinductive properties *in vivo* were studied using a critical-size cranial defect regeneration model in mice. Tomography was performed at 0, 3 and 6 weeks after the operation, euthanasia and

histomorphometry – 42 days after the operation. According to the results of tomography and histological analysis, all implanted biocomposites demonstrated high biocompatibility. Adding of BMP-2 to various biomaterials resulted in a significant osteogenic effect and the formation of large areas of mineralization starting from 3 weeks after surgery. The effect of erythropoietin adding was most significant in the case of PLA.

This work is supported by the Russian Science Foundation (grant no. 16-15-00133).

УДК 577.152.192.31; 547.99; 541.64 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-52-53

ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ ТАКСИФОЛИНА В ГЛУБОКОМ ЭВТЕКТИЧЕСКОМ РАСТВОРИТЕЛЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛАККАЗА-МЕДИАТОРНОЙ СИСТЕМЫ

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

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Ленинский проспект, 33, Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, 117997, ул. Островитянова, 1, Москва, Россия

³ МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия 119991, Москва, Ленинские горы, 1/3

e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru

Проведена окислительная полимеризация флавоноида таксифолина (дигидрокверцетина) в среде бетаин – глицерин (Б-Г, 1:2) как соразтворителя с использованием лакказы из базидиального гриба *Trametes hirsuta* в качестве биокатализатора и ТЭМПО в качестве редокс медиатора. Терминальным окислителем служил атмосферный кислород. При оптимальных условиях синтеза были получены олигомеры дигидрокверцетина (олигоДГК) со среднemasсовой молекулярной массой 1800 г/моль, индексом полидисперсности 1,09 и выходом 57±7%.

Ключевые слова: таксифолин (дигидрокверцетин), глубокие эвтектические растворители, лакказа-медиаторная система, олигомеры

В последнее время глубокие эвтектические растворители (ГЭР) привлекают большое внимание исследователей в области катализа, электрохимии и биотехнологии. ГЭР можно использовать в качестве альтернативных реакционных сред для проведения различных каталитических реакций благодаря их преимуществам по сравнению с традиционными органическими растворителями, такими как нетоксичность, биоразлагаемость, биосовместимость, химическая инертность, простота приготовления путем смешивания компонентов, низкая стоимость.

В настоящей работе исследовали возможность биокаталитической полимеризации в ГЭР таксифолина (дигидрокверцетина, ДГК), природного флавоноида, который обладает широким спектром фармакологического действия, в частности, антиоксидантным, гепатопротекторным, ангиопротекторным, противораковым и др. с целью получения олигомеров с улучшенными биологическими свойствами. Была изучена каталитическая активность и стабильность лакказы из базидиального гриба *Trametes hirsuta* в различных ГЭР на основе бетаина в качестве акцептора водородных связей. Система бетаин – глицерин (Б-Г, 1:2), содержащая 40% v буфера была выбрана для проведения окислительной полимеризации таксифолина. В этой среде лакказа сохраняла ~20% своей первоначальной активности после инкубации при комнатной температуре в течение 7 суток. Биокаталитическую реакцию проводили с использованием лакказа-медиаторной системы. ТЭМПО являлся редокс медиатором, а атмосферный кислород терминальным окислителем. При оптимальных условиях синтеза были получены олигомеры ДГК (олигоДГК) со среднemasсовой молекулярной массой 1800 г/моль, индексом полидисперсности 1,09 и выходом 57±7%. Синтезированные продукты были характеризованы различными физико-химическими методами (УФ-видимая спектроскопия, ИК спектроскопия с преобразованием Фурье, ¹H и ¹³C ЯМР). Предложена схема ферментативной полимеризации ДГК в ГЭР-содержащем буферном растворе.

Полученные результаты указывают, что ГЭР являются перспективными растворителями для проведения биокаталитической полимеризации таксифолина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-08-00104.

UDC 577.152.192.31; 547.99; 541.64 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-52-53

TAXIFOLIN POLYMERIZATION IN DEEP EUTECTIC SOLVENT USING LACCASE-MEDIATOR SYSTEM

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

¹ Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology RAS, Leninskii pr. 33, Moscow, 119071, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University Ostrovitianov str. 1, Moscow, 117997, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Leninskie Gory 1/3, Moscow, 119991, Russia

e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru

An oxidative polymerization of flavonoid taxifolin (dihydroquercetin) in betaine-glycerin (B-G, 1: 2) as cosolvent medium has been performed using laccase from basidial fungus *Trametes hirsuta* as a biocatalyst and TEMPO as a redox mediator. The terminal oxidizing agent was atmospheric oxygen. Under optimal synthesis conditions, dihydroquercetin oligomers (oligo DHQ) with a weight average molecular weight of 1800 g / mol, a polydispersity index of 1.09 and a yield of 57 ± 7% were obtained.

Key words: dihydroquercetin; polymerization; deep eutectic solvent laccase-mediator system, oligomers

Recently, deep eutectic solvents (DESs) have attracted considerable attention in the fields of catalysis, electrochemistry and biotechnology. DESs can be used as alternative reaction mediums for various catalytic reactions due to their advantages compared to traditional organic solvents such as non-toxicity, biodegradability, biocompatibility, chemical inertness, easiness of preparation by mixing components, low prices and others.

In this work, we investigated the possibility of biocatalytic polymerization in DESs of taxifolin (dihydroquercetin, DHQ), a natural flavonoid, which has a wide range of pharmaceutical effects, in particular antioxidant, angioprotective, hepatoprotective, antitumoral and others for the synthesis of oligomers with improved biological properties. The catalytic activity and stability of laccase from basidial fungus *Trametes hirsuta* were studied in various DESs based on betaine which served as an acceptor of hydrogen bonds. The betaine-glycerin system (B-G, 1:2) containing 40% v buffer was selected for the taxifolin (dihydroquercetin, DHQ) oxidative polymerization. In this medium, laccase retained about 20% of its initial activity after 7 days incubation at room temperature. The biocatalytic reaction was carried out using a laccase-mediator system. TEMPO served as a redox mediator, and atmospheric oxygen was a terminal oxidizing agent. Under optimal synthesis conditions, oligomers of DHQ (oligo DHQ) with a weight average molecular weight of 1800 g / mol, a polydispersity index of 1.09 and a yield of 57 ± 7% were obtained.

The synthesized products were characterized by various physicochemical methods (UV-visible spectroscopy, Fourier transform IR spectroscopy, ¹H and ¹³C NMR). A scheme of the DHQ enzymatic polymerization in a DES-containing buffer solution was proposed.

The results obtained suggest that DESs are promising solvents for taxifolin biocatalytic polymerization.

The reported study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project № 20-08-00104).

УДК 606:61 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-53-55

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ-ПРОДУЦЕНТА МОДИФИЦИРОВАННОГО ИНСУЛИН-ПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 1

Кивилев Е.В., Аронова Е.Б., Базарнова Ю.Г.

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

195251, Санкт-Петербург, Политехническая улица, д. 29

e-mail: ewg.kivilev@gmail.com

Получена клеточная культура фибробластов (Fib) из образцов кожи крыс *Rattus norvegicus*, способных экспрессировать ген модифицированного инсулин-подобного фактора роста 1 (IGF-LR3). Показана экспрессия рекомбинантного белка.

Ключевые слова: клеточные культуры; экспрессия белка; инсулин-подобный фактор роста 1.

Инсулин-подобный фактор роста 1 (IGF1, молекулярная масса 7,6 кДа) – гормон, стимулирующий рост тканей организма, является основным медиатором действия гормона роста. IGF-LR3 (молекулярная масса

9,1 кДа) – его модифицированный аналог. Основное преимущество данного белка – большая специфичность по сравнению с природным белком [1]. Патологическая недостаточность IGF1 приводит к нарушениям роста [2]. Относительно невысокий период полураспада известных препаратов, содержащих рекомбинантный IGF1 (Инкрелекс®, Иплекс®) [3, 4] обуславливает поиск новых путей лечения подобных патологических состояний, одним из перспективных подходов к лечению которых является генная терапия.

Цель работы: создание модельной клеточной культуры, способной экспрессировать ген IGF-LR3. В продолжении исследований [5], в результате которых была получена рекомбинантная плаزمиды pcDNA3.1(+)/IGF-LR3, было проведено создание модельной клеточной линии. Культуры клеток фибробластов получали из образцов кожи крыс *Rattus norvegicus*: мелкоизмельченные образцы дермы помещали в среду **Игла-Дульбекко (DMEM)** с добавлением 10 % FBS и 1 % раствора пенициллина, инкубировали при 37 °C с 5 % CO₂ в течение 72-120 часов. Культуры клеток фибробластов (Fib) трансфецировали методом электропорации с использованием смеси, содержащей 20 нг/мкл плазмиды pcDNA3.1(+)/IGF-LR3. Клетки после трансфекции пассировали в среду **DMEM** с добавлением неомицина (50 мкг/мл), культивировали в аналогичных условиях, затем клетки лизировали (УЗИ). Пробы культуральной жидкости анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле в невозобновляющих условиях. Полученный гель окрашивали раствором Кумасси R-250. По результатам электрофореза оценивали экспрессию целевого белка.

Таким образом, получена культура клеток фибробластов, способная экспрессировать белок IGF-LR3. Полученные результаты показали возможность использования данной экспрессионной конструкции для дальнейших исследований и разработок генотерапевтического лекарственного препарата.

Литература

1. Mohan S., Baylink D. J. Beyond carrier proteins: IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and-independent mechanisms // *J endocrinol.* 2002. V. 175. P. 19-31.
2. Laron Z. et al. Body composition in untreated adult patients with Laron syndrome (primary GH insensitivity) // *Clinic. endocrinol.* 2006. V. 65. №. 1. P. 114-117.
3. Fintini D., Brufani C., Cappa M. Profile of mecasermin for the long-term treatment of growth failure in children and adolescents with severe primary IGF-1 deficiency // *Therapeutics and clinical risk management.* 2009. V. 5. P. 553.
4. Guevara-Aguirre J. et al. A randomized, double blind, placebo-controlled trial on safety and efficacy of recombinant human insulin-like growth factor-I in children with growth hormone receptor deficiency // *J. clinic. endocrinol. & metabol.* 1995. V. 80. №. 4. P. 1393-1398.
5. Кивилев Е.В. и др. Создание конструкции, экспрессирующей ген IGF-LR3, как основы для генотерапевтического лекарственного препарата // *Материалы научной конференции с международным участием «Неделя науки СПбПУ».* – СПб. – 2019. – С.139-142.

UDC: 606:61 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-53-55

CREATION OF CELL CULTURE-PRODUCER OF MODIFIED INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1

Kivilev E.V., Aronova Ek.B., Bazarnova Yu.G.

Peter the Great St.Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia
195251, St.Petersburg, Polytechnicheskaya st., 29
e-mail: ewg.kivilev@gmail.com

A cell culture of fibroblasts (Fib) from *Rattus norvegicus* rats skin samples was capable of modified insulin-like growth factor 1 (IGF-LR3) gene expressing was obtained. Recombinant protein expression was shown.

Key words: cell culture; protein expression; insulin-like growth factor 1.

Insulin-like growth factor 1 (IGF1, molecular weight 7.6 kDa) - growth hormone mediator of body tissues, it is a major mediator of growth hormone action. IGF-LR3 (molecular weight 9.1 kDa) - its modified analogue. The main advantage of this protein - is great specificity in against with the natural protein [1]. The pathological insufficiency of the IGF1 leads to growth disorders [2]. The relatively short half-life of known drugs is containing the recombinant IGF1 (Increlex®, Iplex®) [3, 4] is determining of the new ways search to treat these pathological conditions. One of the promising approaches to the treatment of the growth disorders is gene therapy.

Objective: the creation of model cell culture will capable to the IGF-LR3 gene expression.

To the continuation of the study [5] as a result of which the recombinant plasmid construction pcDNA3.1(+)/IGF-LR3 were obtained, a model cell line was created. The fibroblast cell cultures were obtained from rat skin samples of

Rattus norvegicus: finely divided dermis samples were placed on the **Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM)** with the addition of 10% FBS and 1% penicillin solution. The culture was incubated at 37 °C with 5 % CO₂ over 72-120 hours. The fibroblast cell culture (Fib) was transfected by electroporation using a mixture containing 20 ng/μl of pcDNA3.1(+)/IGF-LR3 plasmid. The cells after transfection were passaged in **DMEM** supplemented with neomycin (50 μg/ml), was cultured under similar conditions, then the cells were lysed (sonication). The samples of the culture fluid were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis under non-reducing conditions. The resulting gel was stained with Coomassie R-250. According to the electrophoresis results of target protein expression was evaluated.

Thus, a fibroblast cell culture capable of expressing IGF-LR3 protein was obtained. The results showed the possibility of using this expression system for further gene therapeutic drug research and development.

References

1. Mohan S., Baylink D. J. *Beyond carrier proteins: IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and-independent mechanisms // J endocrinol.* 2002. V. 175. P. 19-31.
2. Laron Z. et al. *Body composition in untreated adult patients with Laron syndrome (primary GH insensitivity) // Clin. endocrinol.* 2006. V. 65. №. 1. P. 114-117.
3. Fintini D., Brufani C., Cappa M. *Profile of mecasermin for the long-term treatment of growth failure in children and adolescents with severe primary IGF-1 deficiency // Therapeutics and clinical risk management.* 2009. V. 5. P. 553.
4. Guevara-Aguirre J. et al. *A randomized, double blind, placebo-controlled trial on safety and efficacy of recombinant human insulin-like growth factor-I in children with growth hormone receptor deficiency // J. clinic. endocrinol. & metabol.* 1995. V. 80. №. 4. P. 1393-1398.
5. Kivilev E.V. et al. *Creation of recombinant expression system include the IGF-LR3 gene as the basis for a gene therapeutic drug // Materials of the scientific conference with international participation "SPbPU Week of Science" – St.Petersburg. – 2019. – P.139-142.*

УДК 579.0 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-55-57

ПЕРВАЯ ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОГО ПОТЕНЦИАЛА АКТИНОБАКТЕРИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С БАЙКАЛЬСКИМИ ЭНДЕМИЧНЫМИ АМФИПОДАМИ

Краснова М.Е., Переляева Е.В., Моргунова М.М., Бельшенко А.Ю., Тимофеев М.А., Аксенов-Грибанов Д.В.

ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия
664003 г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1
e-mail. marriekrasnova@gmail.com

В ходе исследования получены первые материалы, подтверждающие гипотезу, что актинобактерии, ассоциированные с байкальскими эндемичными амфиподами, могут являться оксифилами и синтезировать новые природные соединения с антиоксидантной активностью.

Ключевые слова: актинобактерии, биотехнология, антиоксиданты, кислород, озон, АФК, озеро Байкал.

В связи с увеличением числа нейродегенеративных заболеваний (таких как болезнь Паркинсона, Альцгеймера и др.), в развитии которых большую роль играет окислительный стресс, представляется актуальным поиск новых природных соединений, ингибирующих негативные эффекты активных форм кислорода [2]. Бактерии синтезируют около 70% всех природных соединений, которые имеют важное значение в медицине, фармацевтике и сельском хозяйстве. Среди разнообразия микроорганизмов, способных к синтезу природных соединений, особое значение получили актинобактерии [1].

Микроорганизмы древних и изолированных экосистем обладают огромным потенциалом для поисковых исследований. Экосистема озера Байкал характеризуется низкой температурой воды и экстремально высокой степенью насыщенности воды кислородом (в зимний период - до 18 мг/л). Основной гипотезой проводимого исследования являлось предположение, что актинобактерии, ассоциированные с байкальскими эндемичными амфиподами, обитающими в зимний период в природе в очагах цветения микроводорослей и в зоне гипероксии, могут являться оксифилами и синтезировать новые природные соединения с антиоксидантной активностью.

Исследование посвящено оценке влияния кислорода и озона на морфологические характеристики и антиоксидантный потенциал актинобактерий. Актинобактерии были выделены из байкальских эндемичных амфипод вида *Eulimnogammarus cyaneus* и культивированы в стандартных условиях естественной аэрации

(контроль - 7.3 мг/л), в условиях повышенного содержания кислорода (24.3 мг/л) в колбе (экспериментальные условия 1) и в условиях повышенного содержания кислорода и озона в колбе (экспериментальные условия 2). Для оценки влияния кислорода и озона на морфологические характеристики микроорганизмов, были приготовлены фиксированные препараты, окрашенные методом Грама. Состав природный соединений, синтезируемых актинобактериями, был оценен с помощью подходов высокоэффективной жидкостной хроматографии, масс-спектрометрии высокого разрешения и дерепликации природных соединений с использованием базы данных Dictionary of Natural Products (CRC press-2019).

Показано, что у актинобактерий, культивированных в экспериментальных условиях, отмечается повышение спорообразования по сравнению со стандартными условиями естественной аэрации. Также, показано, что штамм *Streptomyces sp.* синтезирует ряд новых (не зарегистрированных в крупнейшей базе данных) природных соединений только в экспериментальных условиях. Вместе с тем, показано, что *Streptomyces sp.* синтезирует антибиотик и антиоксидант Nocardamine [3] только в экспериментальных условиях.

Таким образом, было показано, что кислород оказывает влияние на даже микроорганизмы, адаптированные к естественной гипероксии. В ответ на предъявляемое стрессовое воздействие показана индукция синтеза известного антиоксиданта, и индукция синтеза не описанных ранее (новых) природных соединений. Данные природные соединения, по-видимому, участвуют в механизмах защиты клеток от окислительного стресса. Таким образом, изучение антиоксидантного потенциала оксифильных микроорганизмов озера Байкал является перспективным биомедицинским направлением современных исследований.

Исследование проведено при основной финансовой поддержке РФФИ (проект 18-29-05051).

Литература

1. Gao B., Gupta R. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria//*Microbiology and molecular biology reviews*. 2012. Vol. 76. № 1. P. 66-112.
2. Mohammadipanah F., Momenilandi M. Potential of rare actinomycetes in the production of metabolites against multiple oxidant agents//*Pharmaceutical Biology*. 2018. Vol. 56. № 1. P. 51-59
3. Ueki M., Suzuki R., Takamatsu S., Takagi H., Uramoto M., Ikeda H., Osada H. Nocardamine production by *Streptomyces avermitilis*//*Actinomycetologia*. 2009. Vol. 23. № 2. P. 34-39.

UDK 579.0 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-55-57

THE FIRST ASSESMENT OF THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF ACTINOBACTERIA ASSOCIATED WITH BAIKAL ENDEMIC AMPHIPODS

Krasnova M.E., Pereliaeva E.V., Morgunova M.M., Belyshenko A.Y., Timofeev M.A., Axenov-Gribanov D.V.

Irkutsk State University, Irkutsk, Russia
664003 Irkutsk, Karl Marx St, 1
e-mail. marriekrasnova@gmail.com

The study obtained the first materials confirming the hypothesis that actinobacteria associated with Baikal endemic amphipods can be oxyphils and synthesize new natural compounds with antioxidant activity.

Key words: actinobacteria, biotechnology, antioxidants, oxygen, Lake Baikal, ozone, ROS

Due to the increase of neurodegenerative diseases (such as Parkinson's and Alzheimer's disease), in the development of which oxidative stress plays a considerable role, it is important to find out new antioxidants, inhibiting the negative effects of reactive oxygen species [2]. Microorganisms produce 70 % of all natural compounds which can be widely used in medicine, pharmacology and agriculture. Among all microorganisms, capable of natural compounds synthesizing, actinobacteria are particularly important [1].

Microorganisms of ancient and unexplored ecosystems are the focus of great scientific interest. Lake Baikal is characterized by low temperature of the water and high content of oxygen (up to 18 mg/l). The main hypothesis was that Actinobacteria associated with Baikal endemic amphipods inhabit littoral zones with seasonal hyperoxia effect may be presented by oxyphilic forms. Also, these bacteria may produce both known and novel natural products with antioxidant activity.

The current study aimed to assess the influence of oxygen and ozone on morphological characteristics and antioxidant potential of actinobacteria. Actinobacteria were isolated from endemic amphipod species *Eulimnogammarus cyaneus*, and then cultivated in standard conditions of natural aeration (control - 7.3 mg/l),

under increased oxygen content (up to 24,3 mg/l) in the flasks (experiment 1), and under conditions of increased oxygen and ozone level (experiment 2). To assess the effects of increased concentration of oxygen and ozone on morphological characteristics of microorganisms, the heat-fixed smears were prepared and colored by Gram-method. The composition of natural products produced by actinobacteria was evaluated using general high-resolution LCMS technique with following dereplication analysis using the Dictionary of Natural Products database (CRC press-2019).

It was shown that actinobacteria cultivated under experimental conditions characterized by elevated level of spore formation compared to conditions of natural aeration. Also, novel natural products were synthesized by studied *Streptomyces sp.* strain only under experimental conditions of the increased level of oxygen.

Moreover, we demonstrated that *Streptomyces sp.* produce antibiotic and antioxidant Nocardamine [3] only under experimental conditionals.

Consequently, it was shown that oxygen influences on lake Baikal microorganisms adapted to natural hyperoxia. We demonstrated synthesis of well-known antioxidant Nocardamine and the appearance of new natural compounds during cultivation under experimental conditions. Natural products apparently involved in the cells protection mechanisms to oxidative stress. Thus, the study of the antioxidant potential of Lake Baikal oxyphilic bacteria is a promising biomedical direction of modern research.

The study was carried out with main financial support of RFBR (projects 18-29-05051).

References

1. Gao B., Gupta R. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria//Microbiology and molecular biology reviews. 2012. Vol. 76. № 1. P. 66-112.
2. Mohammadipanah F., Momenilandi M. Potential of rare actinomycetes in the production of metabolites against multiple oxidant agents//Pharmaceutical Biology. 2018. Vol. 56. № 1. P. 51-59
3. Ueki M., Suzuki R., Takamatsu S., Takagi H., Uramoto M., Ikeda H., Osada H. Nocardamin production by *Streptomyces avermitilis*//Actinomycetologia. 2009. Vol. 23. № 2. P. 34-39.

УДК 616:579.61 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-57-59

ДЕЙСТВИЕ МЕТАБОЛИТОВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ.

Лазарев С.А., Михайлова Н.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» 105064, г. Москва, Малый Казенный переулок, дом 5А
e-mail: lazarevsr1@gmail.com

Биопленочные микроорганизмы из-за высокой персистенции создают проблемы в медицинской практике. Показано, что метаболиты штаммов *Bacillus subtilis* ингибируют биопленкообразование условно патогенных бактерий.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, биологически активные метаболиты, биопленкообразование.

В настоящее время доказано, что в естественной среде большинство бактерий преимущественно существуют в виде специфически организованных биопленок, формирующихся за счет синтеза экзополисахаридов [1,2]. Такие структурированные микробные сообщества создают проблемы для медицинской практики из-за повышенной устойчивости к эффекторам иммунной системы, дезинфектантам и антибиотикам [3]. Известно, что бактерии рода *Bacillus* продуцируют биологически активные метаболиты, в том числе антибактериальные вещества и ферменты, способные расщеплять полисахариды [4].

Цель исследования – изучение влияния метаболитов, продуцируемых штаммами *Bacillus subtilis*, на биопленкообразование возбудителей хронических бактериальных инфекций. В работе использовали штаммы *B. subtilis* 3Н, *B. subtilis* 1719, *S. aureus* 29213, *S. aureus* 209 FDA, *P. aeruginosa* 103, *E. coli* ATCC 25922 из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Для получения метаболитов штаммов *Bacillus subtilis* проводили периодическое глубинное культивирование в течение 24 часов при температуре 37°C на картофельно-глюкозном бульоне с добавлением промышленных гидролизатов. Супернатанты, содержащие метаболиты *B. subtilis*, получали центрифугированием с последующей стерилизацией через мембранные фильтры 0,2 мкм. Для изучения влияния метаболитов на биопленкообразование полученные супернатан-

ты смешивали с питательным бульоном и добавляли к ним чистые культуры тест-штаммов. В контроле вместо супернатантов использовали питательный бульон. Образование биопленок определяли по способности тест-штаммов к адгезии на поверхности 96-луночного стерильного планшета через 24 часа культивирования [5]. Сформировавшиеся биопленки оценивали по степени окрашивания спирта кристалл виолетом на планшетном спектрофотометре при длине волны 520 нм. Результаты подсчета обрабатывали в программе Excel, определяя средние арифметические значения для каждого тест-штамма.

В результате исследования выявлено, что при добавлении супернатанта штамма *B.subtilis* 3H происходило снижение оптической плотности биопленки по сравнению с контролем у штаммов *S.aureus* 29213 с 1,79 до 0,96 ед., *S.aureus* FDA-209P с 1,59 до 0,79 ед., *P.aeruginosa* 103 с 1,95 до 1,42 ед., *E.coli* ATCC 25922 с 1,53 до 0,96 ед. Под влиянием супернатанта штамма *B.subtilis* 1719 образование биопленок снижалось у *S.aureus* 29213 с 1,79 до 1,2 ед., *S.aureus* FDA-209P с 1,59 до 0,93 ед., *P.aeruginosa* 103 с 1,95 до 1,57 ед., *E.coli* ATCC 25922 с 1,53 до 0,75 ед. Таким образом, полученные данные выявили ингибирующее действие метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* на образование биопленок условно патогенными бактериями.

Литература

1. Romling U., C. Balsalobre. *Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies* // *J. Intern. Med.* 2012. Vol. 272. P. 541–561.
2. Teschler J. K. *Living in the matrix: assembly and control of Vibrio cholerae biofilms* // *Nature Reviews Microbiology.* 2015. – Vol. 13. – P. 255–268.
3. Sun F. *Biofilm-Associated Infections Antibiotic Resistance and Novel Therapeutic Strategies* // *Future Microbiol.* 2013. Vol. 8, N 7. P. 877–886.
4. Заборицкий Н.А. Биологически активные вещества, синтезируемые пробиотическими микроорганизмами родов *Bacillus* и *Lactobacillus* // *Журнал научных статей здоровье и образование в 21 веке.* – 2015. – № 3. – С.80-90
5. O'Toole G., Kaplan H., Kolter R. *Biofilm formation as microbial development.* *Annu. Rev. Microbiol.* 2000. 54: 49–79.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-57-59

ACTION OF METABOLITES PROBIOTIC STRAINS *BACILLUS SUBTILIS* ON THE BIOFILM FORMATION OF OPPORTUNISTIC BACTERIA.

Lazarev S.A., Mikhaylova N.A.

Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera» 105064, Moscow, Малый Казенный переулоч, дом 5А
e-mail: lazarevsr1@gmail.com

In the natural environment, most microorganisms exist in the form of biofilms, which provide significant advantages for their persistence in the environment. As means to overcome the biofilm formation of opportunistic bacteria, the metabolites of *Bacillus subtilis* probiotic strains are of interest.

Key words: *Bacillus subtilis*, biologically active metabolites, biofilm formation.

Currently, it has been proven that in the natural environment, most bacteria mainly exist in the form of specifically organized biofilms that are formed due to the synthesis of exopolysaccharides [1,2]. Such structured microbial communities pose problems for medical practice due to increased resistance to immune system effectors, disinfectants, and antibiotics [3]. *Bacillus* bacteria are known to produce biologically active metabolites, including antibacterial substances and enzymes that can break down polysaccharides [4].

The purpose of the research was to study the effect of metabolites produced by *Bacillus subtilis* strains on the biofilm formation of chronic bacterial infections activators. We used the strains *B.subtilis* 3H, *B.subtilis* 1719, *S.aureus* 29213, *S. aureus* 209 FDA, *P.aeruginosa* 103, *E.coli* ATCC 25922 from I. Mechnikov NIIVS collection. To obtain metabolites of *Bacillus subtilis* strains, periodic deep cultivation was carried out 24 hours at a temperature of 37 °C in potato-glucose broth with the addition of industrial hydrolysates. Supernatants containing *B.subtilis* metabolites were obtained by centrifugation by followed sterilization through 0.2 µm membrane filters. To study the effect of metabolites on biofilm formation, the obtained supernatants were mixed with nutrient broth and pure cultures of test-strains were added to them. In the control, a nutrient broth was used instead of supernatants. Biofilm formation was determined by the ability of the test-strains to adhere to the surface of a 96-well sterile plate after 24 hours of cultivation [5]. The formed biofilms were evaluated by the degree of staining of the alcohol with

crystal violet on a tablet spectrophotometer at a wavelength of 520 nm. The calculation results were processed in Excel, determining the arithmetic mean values for each test-strain.

As a result of the research, it was found that when the supernatant of *B. subtilis* 3H strain was added, the optical density of the biofilm decreased as compared to the control for *S. aureus* 29213 from 1.79 to 0.96 units, *S. aureus* FDA-209P from 1.59 to 0.79 units, *P. aeruginosa* 103 from 1.95 to 1.42 units, *E. coli* ATCC 25922 from 1.53 to 0.96 units. Under the influence of the supernatant *B. subtilis* 1719 strain, the formation of biofilms decreased for *S. aureus* 29213 from 1.79 to 1.2 units, *S. aureus* FDA-209P from 1.59 to 0.93 units, *P. aeruginosa* 103 from 1, 95 to 1.57 units, *E. coli* ATCC 25922 from 1.53 to 0.75 units. Thus, the obtained data revealed the inhibitory effect of metabolites *Bacillus subtilis* probiotic strains on the biofilms formation by opportunistic bacteria.

References

1. Romling U., C. Balsalobre. *Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies* // *J. Intern. Med.* 2012. Vol. 272. P. 541–561.
2. Teschler J. K. *Living in the matrix: assembly and control of Vibrio cholerae biofilms* // *Nature Reviews Microbiology.* 2015. – Vol. 13. – P. 255–268.
3. Sun F. *Biofilm-Associated Infections Antibiotic Resistance and Novel Therapeutic Strategies* // *Future Microbiol.* 2013. Vol. 8, N 7. P. 877–886.
4. N.A. Zabokritskiy. *The biologically active substances produced probiotic microorganisms of the genera Bacillus and Lactobacillus* // *The Journal of scientific articles "Health and Education Millennium"*, 2015. Vol. 17. No 3
5. O'Toole G., Kaplan H., Kolter R. *Biofilm formation as microbial development.* *Annu. Rev. Microbiol.* 2000. 54: 49–79.

УДК 544.773.432 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-59-61

СТЕРИЛЬНЫЕ ГЕЛИ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА

Маклакова И.А.

Общество с ограниченной ответственностью «МакМеди» г. Москва, Россия
127247, г. Москва, ул. 800-летия Москвы, д. 6, кв. 213
e-mail: imaklakova@yandex.ru

Получены стерильные формы коллагена: биodeградируемый матрикс и гели разной плотности с физиологическим значением pH для применения в создании медицинских изделий и биомедицинских клеточных продуктов. Разработанные медицинские изделия на основе коллагена внедрены в клиническую практику.

Ключевые слова: коллаген, биodeградируемый матрикс, биоматрикс, гели.

Получен биodeградируемый стерильный матрикс на основе коллагена для клеточных технологий. Для получения биоматрикса использован высокоочищенный коллаген II типа из соединительной ткани с/х животных. Биоматрикс представляет собой суспензию частиц сшитого коллагена в солевом растворе с физиологическим значением pH. Матрикс может быть использован для культивирования и обогащения клеточными структурами и их субстратами с целью последующего применения для восстановления повреждений соединительной ткани. Суспензия частиц коллагена устойчива в физиологических средах при температуре 37°C. Размер частиц коллагена не превышает 0,5 мм, что позволяет проводить введение обогащенного клеточными продуктами носителя через канюлю соответствующего диаметра в зону повреждения. После введения матрикс обеспечивает необходимые условия жизнедеятельности клеточных структур. Полная биodeградация в организме происходит в течение нескольких месяцев.

Особый интерес представляет создание стерильных мягких гелей коллагена для нанесения на раневые поверхности кожи и слизистой человека, в том числе методом распыления, а также для инъекционного введения в дефектные зоны соединительной ткани. Нами разработан технологический подход, позволяющий получать стерильные формы коллагена в виде гелей разной плотности с физиологическим значением pH.

Суть подхода заключается в преодолении образования избыточного количества межмолекулярных связей в коллагеновых системах при стерилизации ионизирующим излучением путем целенаправленного изменения супрамолекулярной организации водных систем коллагена.

Биологическая безопасность доказана практикой клинического применения медицинских изделий для офтальмологии, производимых на основе коллагена по разработанной технологии.

Работа направлена на создание медицинских изделий, косметических и лекарственных средств на основе коллагена.

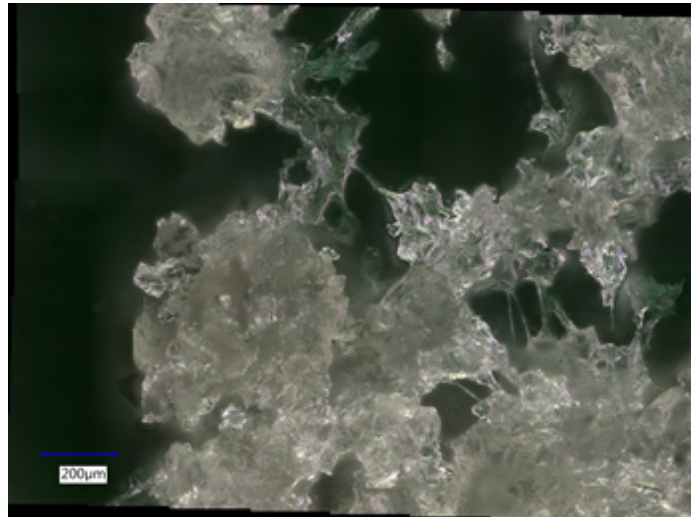


Рисунок 1. Микрофотография высушенного образца биоматрикса

Литература

1. Егорова Н.С., Ченцова Е.В., Боровкова Н.В., Макаров М.С., Сторожева М.В., Маклакова И.А. Оценка эффективности биоконструкции с клетками буккального эпителия на основе коллагеновых матриц при лечении дефектов роговицы кролика // *Катарактальная и рефракционная хирургия.* – 2017. – № 2. – С. 52-58.
2. Ченцова Е.В., Макаров М.С., Боровкова Н.В., Конюшко О.И., Егорова Н.С. Способ лечения глубоких дефектов роговицы // Патент России №2609253.2017. Бюл. № 4.
3. Егорова Н.С. Комбинированная биоконструкция с клетками буккального эпителия в лечении повреждений роговицы в эксперименте: дис. ...канд. мед. наук. – М, 2017. – 128 с.
4. Маклакова И.А., Борисова Л.М. Биоматериал для стабилизации прогрессирующей миопии «Коллаплант» // Патент России №2272599.2006. Бюл. № 9.

UDC 544.773.432 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-59-61

STERILE GELS BASED ON COLLAGEN

Maklakova I.A.

"MakMedi" Ltd. Moscow, Russia
127247, Moscow, ulitsa 800-letiya Moskvy, 6-213
e-mail: imaklakova@yandex.ru

Sterile forms of collagen were obtained: a biodegradable matrix and gels of different densities with physiological pH for application in creation of medical devices and biomedical cell products. Developed medical products based on collagen have been introduced into clinical practice.

Key words: collagen, biodegradable matrix, biomatrix, gels.

A biodegradable sterile collagen matrix was obtained for cell technology. To obtain biomatrix, highly purified type II collagen from connective tissue of agricultural animals was used. Biomatrix is a suspension of cross-linked collagen particles in salt solution with physiological pH. The matrix can be used for cultivation and enrichment with cellular structures and their substrates for the purpose of subsequent use to repair damaged connective tissue. The suspension of collagen particles is stable in physiological environments at a temperature of 37°C. The collagen particle size does not exceed 0.5 mm, which allows the introduction into the damage zone of a carrier enriched with cellular products through a cannula of the appropriate diameter. After the introduction of the matrix provides the necessary conditions for the activity of cellular structures. Complete biodegradation in the body occurs within a few months.

Of particular interest is the creation of sterile soft collagen gels for application to wound surfaces of the skin and mucous membrane of a person, including by spraying, as well as for injection into the defective areas of connective tissue. We have developed a technological approach that allows to obtain sterile forms of collagen in the form of gels of different densities with a physiological pH value.

The essence of the approach is to overcome the formation of an excessive amount of intermolecular bonds in collagen systems during sterilization by ionizing radiation by purposefully changing the supramolecular organization of collagen water systems.

Biological safety is proved by the practice of the clinical use of medical products for ophthalmology, produced on the basis of collagen according to the developed technology.

The work is aimed at the creation of medical products, cosmetics and medicines based on collagen.

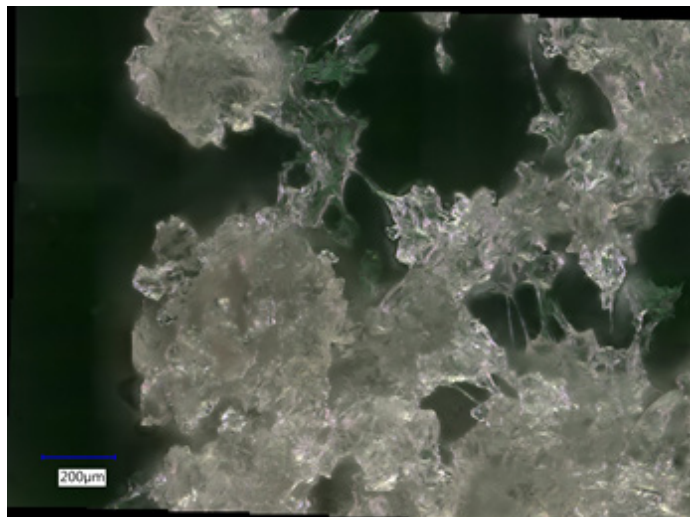


Figure 1. Microphotography of a dried sample of the biomatrix

References

1. Egorova N.S., Chentsova E.V., Borovkova N.V., Makarov M.S., Storozheva M.V., Maklakova I.A. Evaluation of the effectiveness of bioconstruction with buccal epithelial cells based on collagen matrices in the treatment of rabbit corneal defects // *Cataract and refractive surgery.* –2017. – No. 2. – P. 52-58.
2. Chentsova E.V., Makarov M.S., Borovkova N.V., Konyshko O.I., Egorova N.S. A method for the treatment of deep corneal defects // *Russian patent №2609253.2017. Bull. No. 4.*
3. Egorova N.S. Combined bioconstruction with buccal epithelial cells in the treatment of corneal lesions in an experiment: *Ph. D thesis – M, 2017. – 128 p.*
4. Maklakova I.A., Borisova L.M. Biomaterial for stabilization of progressive myopia "Collaplant" // *Russian patent №2272599.2006. Bull. No. 9.*

УДК 547.458.82 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-61-63

БИОСИНТЕЗ И ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Миринова Г.Ф., Гисматулина Ю.А., Корчагина А.А., Гладышева Е.К., Будаева В.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Бийск, Россия
659322, Бийск, ул. Социалистическая, 1
e-mail: yur_galina@mail.ru

Данная работа была направлена на масштабирование биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы (БНЦ) и ее функционализацию с получением нитратов целлюлозы (НЦ).

Ключевые слова: биосинтез; масштабирование; бактериальная наноцеллюлоза; функционализация; нитрование; нитраты целлюлозы.

В последние годы наблюдается резкий всплеск интереса к БНЦ и, в частности, к ее практическому применению. БНЦ стала широко известна как многофункциональный нанобиоматериал благодаря своим уникальным физико-механическим и химическим свойствам. Как самостоятельный материал БНЦ имеет особенно много применений в медицине, а также в пищевой, электронной текстильной, бумажной, косметической областях [1]. Различные способы функционализации БНЦ позволяют создавать материалы

с улучшенными или новыми свойствами и еще больше расширяют области ее применения [2]. БНЦ, как и всякая целлюлоза, может быть также карбоксиметилирована, ацетилована, фосфорилирована и модифицирована с помощью других реакций для получения ряда производных БНЦ. Перспективным направлением химической функционализации БНЦ является ее нитрование. Благодаря своим уникальным физическим свойствам НЦ являются одними из важнейших производных целлюлозы и широко используются в промышленных целях [3].

В данной работе выполнен трехкратный циклический биосинтез БНЦ на полусинтетической питательной среде с помощью *Medusomyces gisevii* Sa-12 при возрастающих объемах питательной среды от 10 л до 72 л. Получено 9432 г гель-пленок БНЦ. Для нитрования взят образец БНЦ массой 6800 г. Образец характеризовался массовой долей α-целлюлозы – 99 %, степенью полимеризации – 4000. Образец БНЦ был лиофильно высушен и измельчен. Нитрование БНЦ проводилось в условиях получения низкоазотных НЦ [4].

В результате получены НЦ с массовой долей азота 10,96 %. Выход НЦ 158 % сопоставим с выходом НЦ из растительной целлюлозы 148–157 %. Полученный образец НЦ имел более высокую вязкость 916 сП по сравнению с 0,6–72 сП для коммерческих НЦ и с 4–35 сП для НЦ из растительной целлюлозы, полученных в аналогичных условиях. При сравнении морфологии поверхности волокон БНЦ и НЦ обнаружено, что трехмерная сетчатая структура исходной БНЦ полностью сохраняется при незначительном утолщении самих нановолокон. Методами ИК, ТГА/ДТА, ¹³C ЯМР достоверно доказано, что полученный продукт является НЦ.

Значительная разница в характеристиках НЦ из БНЦ и НЦ из растительной целлюлозы связана с уникальной трехмерной сетчатой структурой, высокой степенью полимеризации и природной пластинчатой формой первой. Учитывая особенности НЦ из БНЦ, необходимо искать особые области применения, где требуются высоковязкие характеристики НЦ. В процессе определения вязкости (растворение НЦ в ацетоне) было обнаружено, что НЦ образует прозрачный высоковязкий органогель – непрерывную трёхмерную макромолекулярную сетку, выступающую в роли каркаса, пустоты в которой заполнены низкомолекулярным ацетоном. Области возможного применения данного органогеля еще не определены. Возможно, высокая степень чистоты и уникальная структура НЦ из БНЦ позволит использовать их в современных наукоемких областях, например, в составах для склейки изделий и элементов электротехники, нитролаков специального назначения и др. [4].

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054) при использовании приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск).

Литература

1. Gama M., Dourado F., Bielecki S. (Eds.). *Bacterial nanocellulose: from biotechnology to bio-economy*. Elsevier, 2016. 260 p.
2. Choi S.M., Shin E.J. *The nanofication and functionalization of bacterial cellulose and its applications // Nanomaterials*. 2020. Vol. 10. № 406. doi: 10.3390/nano10030406.
3. Luo Q., Zhu J., Li Z. et al. *The solution characteristics of nitrated bacterial cellulose in acetone // New J. Chem*. 2018. Vol. 42. P. 18252–18258. doi: 10.1039/C8NJ02018C.
4. Budaeva V.V., Gismatulina Yu. A., Mironova G.F. et al. *Bacterial nanocellulose nitrates // Nanomaterials*. 2019. Vol. 9(12). № 1694. doi: 10.3390/nano9121694.

UDC 547.458.82 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-61-63

BIOSYNTHESIS AND FUNCTIONALIZATION OF BACTERIAL NANOCELLULOSE FOR INDUSTRIAL APPLICATIONS

Mironova G.F., Gismatulina Yu. A., Korchagina A.A., Gladysheva E.K., Budaeva V.V.

*Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (IPCET SB RAS), Biysk, Russia
659322, Russia, Biysk, ul. Socialisticheskaya, 1
e-mail: yur_galina@mail.ru*

This study aimed at scale-up the biosynthesis of bacterial nanocellulose (BNC) and its functionalization with the production of cellulose nitrates (CNs).

Key words: biosynthesis; scale-up; bacterial nanocellulose; functionalization; nitration; cellulose nitrates.

In recent years, there has been a sharp surge in interest in BNC and, in particular, in its practical application. BNC has become widely known as a multifunctional nanobiomaterial due to its unique physico-mechanical and

chemical properties. As an independent material, BNC has especially many applications in medicine, as well as in food, electronic, textile, paper, and cosmetic fields. [1]. Various methods of BNC functionalization make it possible to create materials with improved or new properties and further expand the scope of its application. [2]. BNC, as any other cellulose, can also be carboxymethylated, acetylated, phosphorylated, and modified by other reactions to produce a variety of BNC derivatives. The promising direction in chemical modification of BNC is its nitration. Due to its unique physical properties, CNs are one of the most important cellulose derivatives and are widely used for industrial purposes. [3].

In this work, we performed a three-cycle biosynthesis of BNC on a semisynthetic nutrient medium using *Medusomyces gisevii* Sa-12 with increasing volume of the nutrient medium from 10 L to 72 L. 9432 g of BNC gel-films were obtained. For nitration, the 6800-g BNC sample chosen. The sample characterized by an α -cellulose content of 99%, a polymerization degree of 4000. The BNC sample was freeze-dried and crushed. BNC was nitrated under conditions required for the synthesis of low-nitrogen CNs [4].

As a result, CNs with a nitrogen content of 10.96 % obtained. The yield of CNs equal to 158 % is comparable to the yield of CNs from plant cellulose equal to 148–157 %. The resultant CN sample had a higher viscosity of 916 cP compared to 0.6–72 cP of commercial CNs and 4–35 cP of CNs from plant cellulose obtained under similar conditions. It was found by comparing the surface morphologies of BNC and CN fibers that the 3D reticulate structure of original BNC retained in full with the nanofibers themselves thickened marginally. Different techniques such as IR, TGA/DTA and ^{13}C NMR verified that the resultant nitration product was CN.

The substantial difference between characteristics of BNC-based CN and plant cellulose-based CN is due to the unique 3D reticulate structure, high degree of polymerization, and plate-like shape of BNC. Taking cognizance of the features of BNC-based CN, one should seek special fields of application in which high-viscosity properties of CN are required. It was found by measuring the viscosity (dissolution of CN in acetone) that BNC-based CN generated a transparent, highly viscous organogel that represents a continuous 3D macromolecular network serving as a framework whose voids are filled with low-molecular acetone. The potential application fields of this organogel have not yet been identified. Probably, the high purity and unique structure of BNC-based CN will allow it to be used in modern science-driven areas, for example, in adhesive formulations for gluing items and electronics components, in special-purpose nitrolacquers, etc. [4].

The research was supported by the Russian Science Foundation (project № 17-19-01054) using equipment provided by the Biysk Regional Center for Shared Use of Scientific Equipment (IPCET SB RAS, Biysk).

References

1. Gama M., Dourado F., Bielecki S. (Eds.). *Bacterial nanocellulose: from biotechnology to bio-economy*. Elsevier, 2016. 260 p.
2. Choi S.M., Shin E.J. *The nanofication and functionalization of bacterial cellulose and its applications // Nanomaterials*. 2020. Vol. 10. № 406. doi: 10.3390/nano10030406.
3. Luo Q., Zhu J., Li Z. et al. *The solution characteristics of nitrated bacterial cellulose in acetone // New J. Chem*. 2018. Vol. 42. P. 18252–18258. doi: 10.1039/C8NJ02018C.
4. Budaeva V.V., Gismatulina Yu. A., Mironova G.F. et al. *Bacterial nanocellulose nitrates // Nanomaterials*. 2019. Vol. 9(12). № 1694. doi: 10.3390/nano9121694.

УДК: [606:61]:612.419.014, ББК: 28.070 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-63-65

РАЗРАБОТКА КОСТНО-ПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, ИМПРЕГНИРОВАННОГО ПЛАЗМИДОЙ С ГЕНОМ КОСТНОГО МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО БЕЛКА-2

И.А.Недурובה¹, Т.Б.Бухарова¹, А.В.Васильев², А.А.Кулаков², Д.В.Гольдштейн¹

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Россия, 115478, Москва, Москворечье, 1, irina0140@gmail.com, 89104602623

² Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, Россия, 119021, Москва, Тимур Фрунзе, 16, e-mail: irina0140@gmail.com, 89104602623

Разработан новый ген-активированный костно-пластический материал на основе хитозана, импрегнированный плазмидой с геном BMP-2, оказывающий остеоиндуцирующее действие на мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК).

Ключевые слова: BMP-2, генная терапия, плазмиды, регенерация костной ткани, ген-активированный материал.

Костный морфогенетический белок-2 (BMP-2) является мощным остеоиндуктивным фактором, по своему регенеративному потенциалу не уступающий аутологичной костной ткани. Поскольку BMP-2 является паракринной молекулой с коротким периодом полураспада и может быстро терять активность, требуется его введение в супрафизиологических концентрациях, что приводит к побочным эффектам и ограничивает использование остеопластических материалов на основе рекомбинантного белка. Включение в материал плазмидных конструкции, содержащих ген BMP-2 поможет обеспечить пролонгированную секрецию BMP-2 в терапевтических концентрациях для эффективной регенерации костной ткани.

Целью работы является разработка ген-активированного материала на основе плазмиды с геном BMP-2 и оценка его остеоиндуцирующего действия *in vitro*.

Материалы и методы. Использовали плазмиды, несущие целевой ген *BMP-2* (pcDNA3 и TaqRFP-NN1) и ген референсного белка EGFP (pEGFP-C1). Для *in vitro* исследований ММСК высевали на планшеты и проводили трансфекцию с различными трансфицирующими агентами: катионные полимеры (Polyethylenimine – PEI и TurboFect – TF) и липосомальные (Lipofectamine 2000). Эффективность трансфекции оценивали на флуоресцентном микроскопе и с помощью проточной цитофлуориметрии по количеству клеток, экспрессирующих EGFP. Цитотоксическое действие трансфицирующих комплексов оценивали методом МТТ. Методом ПЦР-анализа и путем окрашивания ализариновым красным оценивали развитие остеогенной дифференцировки ММСК.

Результаты. При сравнении различных трансфицирующих агентов TF проявил себя как наиболее эффективный. Проанализировали различные соотношения доз плазмид pEGFP-C1 (1 мкг и 2 мкг) и TF (1 мкл, 2 мкл и 4 мкл). Через 24 ч наиболее эффективными оказались соотношения 1 мкг pEGFP-C1 с 2 мкл TF (25,12%) и 2 мкг pEGFP-C1 с 4 мкл TF (28,59%). Методом МТТ показали, что TF оказывает сильное доза-зависимое цитотоксическое действие на ММСК. Для снижения цитотоксичности уменьшили время инкубации клеток с трансфицирующими комплексами до 6 ч и 1 ч. Оказалось, что инкубации клеток с комплексами (2 мкг pEGFP-C1 + 4 мкл TF) в течение 1 ч достаточно для эффективной трансфекции ММСК (15,32%) с сохранением высокой жизнеспособности клеток (83,58%). Кроме того, исследовали эффективность трансфекции ММСК в условиях суспензии при инкубации клеток с трансфицирующими комплексами в течение 10 мин и 1 ч с последующим удалением комплексов центрифугированием или без него. Показали, что 10 мин инкубации клеток 2 мкг pEGFP-C1 с 4 мкл TF с последующим центрифугированием и без него приводит к трансфекции ММСК, но вызывает значительную гибель клеток, даже в образцах с центрифугированием. Остеопластические материалы получали путем импрегнации плазмид в комплексе с TF на хитозановых губках и оценивали эффективность трансфекции ММСК при использовании плазмид с геном *EGFP*. При добавлении трансфицирующих комплексов с геном BMP-2 через 14 суток наблюдалось развитие остеогенной дифференцировки – увеличение экспрессии остеогенных маркеров и образование очагов минерализации.

Таким образом, полученные ген-активированные материалы, импрегнированные плазмидными конструкциями с геном BMP-2 могут стать перспективным решением для обеспечения регенерации костной ткани.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке РФФИ [грант № 16-1500298].

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-63-65

DEVELOPMENT OF OSTEOPLASTIC MATERIAL IMPREGNATED WITH PLASMID ENCODING BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2

I. Nedorubova¹, T. Bukharova¹, A. Vasilyev², A. Kulakov², D. Goldstein¹

¹ Research Centre of Medical Genetics, Russia, 115478, Moscow, Moskvorechye, 1

² Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery, Russia, 119021, Moscow, Timur Frunze, 16

A new gene-activated osteoplastic based on chitosan material impregnated with plasmid with the BMP-2 gene has been developed. The material had an osteoinductive effect on mesenchymal stromal cells (MSC).

Key words: BMP-2, gene therapy, plasmids, bone regeneration, gene-activated material.

Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) is a potent osteoinductive factor, which regenerative potential is not inferior to autologous bone tissue. However, BMP-2 has a very short half-life and may rapidly lose bioactivity. Therefore, its introduction in supraphysiological concentrations is required, that leads to side effects and limits the use of osteoplastic materials with recombinant protein. The material impregnated with plasmid constructs containing the BMP-2 gene can provide prolonged secretion of BMP-2 at therapeutic concentrations for more effective bone regeneration.

The aim of this work is development of gene-activated material impregnated with plasmid containing BMP-2 gene and evaluation of its osteoinductive effect *in vitro*.

Materials and methods. Plasmids encoding the target *BMP-2* gene (pcDNA3 and TaqRFP-NN1) and the reference EGFP gene (pEGFP-C1) were used. MSC were seeded for *in vitro* studies and transfected with various transfection agents: cationic polymers (Polyethylenimine - PEI and TurboFect - TF) and liposomes (Lipofectamine 2000). Transfection efficiency is assessed by fluorescence microscope and by flow cytometry by counting cells expressing EGFP. Cytotoxicity of the transfection complexes was estimated by the MTT assay. The development of osteogenic differentiation of MSC was evaluated by PCR and staining with alizarin red.

Results. While comparing various transfection agents, TF has proven to be the most effective. Various dose ratios of plasmids pEGFP-C1 (1µg and 2µg) and TF (1µl, 2µl and 4µl) were analyzed. The most effective ratios were 1µg pEGFP-C1 with 2µl TF (25.12%) and 2µg pEGFP-C1 with 4µl TF (28.59%) after 24h of incubation. It has been shown that TF exert a strong dose-dependent cytotoxic effect on MSC by MTT assay. To reduce cytotoxicity, the incubation time of cells with transfection complexes was reduced to 6h and 1h. It was found that incubation of cells with complexes (2µg pEGFP-C1 + 4µl TF) for 1h is enough for efficient transfection MSC (15.32%) with maintaining high cell viability (83.58%). In addition, the transfection efficiency of MSC under suspension conditions was investigated. Suspension cells were incubated with transfection complexes for 10min and 1h, followed by removal of the complexes by centrifugation or without it. It was shown that 10min incubation of 2µg pEGFP-C1 with 4µl TF followed by centrifugation and without it, leads to transfection of MSC, but causes significant cell death, even in samples with centrifugation. Osteoplastic materials were obtained by impregnation of plasmids along with TF into chitosan sponges. The transfection efficiency of gene-activated material was evaluated by using plasmids with the EGFP gene. The development of osteogenic differentiation was observed (an increase in the expression of osteogenic markers and the formation of foci of mineralization) after 14 days when transfection complexes with the BMP-2 gene were added.

Thus, the obtained gene-activated materials impregnated with plasmid constructs with BMP-2 gene may be a promising solution for the bone regeneration.

Grant: The research was supported by the RSF [grant n. 16-1500298]

УДК 577.115, 577.125, 547.915.5 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-65-66

ПРИМЕНЕНИЕ МНОГОКОМПОНЕНТНОЙ РЕАКЦИИ УГИ ДЛЯ СИНТЕЗА ЛИПОФИЛЬНЫХ ПОЛИАМИНОВ

Ничуговский А.И., Маслов М.А.

Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия, 119571, пр-т Вернадского, 86
e-mail: ashpwnz77@gmail.com

Разработана схема синтеза и синтезированы производные липофильных полиаминов используя "жертвенную" реакцию Уги.

Ключевые слова: полиамины, диглицериды, изонитрилы

В настоящее время существует серьезная проблема с развитием устойчивости раковых клеток к различным противоопухолевым агентам. В связи с этим поиск новых противоопухолевых препаратов - одна из основных задач современной онкологии. Было показано, что алкилглицеролипиды, содержащие в своей структуре полиаминовый домен проявляют противоопухолевую активность на различных раковых клетках при микромолярных концентрациях [1].

В последние годы возрос интерес к многокомпонентным реакциям из-за их экономичности, высокой конверсии. Одной из таких реакций является многокомпонентная реакция Уги, которая заключается во взаимодействии амина, альдегида, карбоновой кислоты и изоцианида. Существует несколько модификаций этой реакции: Уги-Смайlsa, Уги-Дильса-Альдера, N-разделённая реакция Уги [2], жертвенная реакция Уги [3] и др.

Ранее в нашей лаборатории были синтезированы соединения на основе многокомпонентной N-разделённой реакции Уги. Было установлено, что в случае использования алифатического диамина и формальдегида основным побочным продуктом является соответствующий аминаль. С целью увеличения выхода целевых молекул было предложено использовать реакцию Уги с 2-(гидрокси-метил)бензойной кислотой, который во время перегруппировки Мамма элиминировался с образованием фталида.

Был успешно синтезирован ряд полиаминов с использованием алифатических и циклических диаминов. На первом этапе синтеза в качестве исходных компонентов был использован дибензилпропандиамин, формальдегид, 2-(гидроксиметил)бензойная кислота и коммерчески доступный изонитрил. На втором этапе, полученный β аминокламид вводили во взаимодействие с изонитрильным производным диглицерида, формальдегидом и 2-(гидроксиметил)бензойной кислотой получая несимметричный β -аминокламид. Восстановление проводили фенилсиланом в присутствии хлорида никеля с высоким выходом.

Работа поддержана Минобрнауки Российской Федерации (проект № 0706-2020-0019).

Литература

1. Perevoshchikova K. A. et al. Synthesis of novel lipophilic tetraamines with cytotoxic activity //Mendeleev Communications. – 2019. – Т. 29. – №. 6. – С. 616-618.
2. Pirali T. et al. A concise entry into nonsymmetrical alkyl polyamines //Organic letters. – 2008. – Т. 10. – №. 19. – С. 4199-4202.
3. La Spisa F. et al. An efficient synthesis of symmetric and unsymmetric Bis-(β -aminoamides) via Ugi multicomponent reaction //Organic letters. – 2012. – Т. 14. – №. 23. – С. 6044-6047.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-65-66

APPLICATION OF A MULTICOMPONENT UGI REACTION FOR SYNTHESIS OF LIPOPHILIC POLYAMINES

Nichugovskiy A.I., Maslov M.A.

Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA Russian Technological University, Moscow, Russia
119571, Vernadsky Ave, 86
e-mail: ashpwnz77@gmail.com

A synthesis scheme was developed and derivatives of lipophilic polyamines were synthesized using the sacrificial Ugi reaction.

Key words: polyamines, diglycerides, isonitriles

Currently, there is a serious problem with the development of resistance of cancer cells to various anticancer agents. In this regard, the search for new anticancer drugs is one of the main tasks of modern oncology. It has been shown that alkyl glycerolipids containing a polyamine domain in their structure exhibit antitumor activity on various cancer cells at micromolar concentrations [1].

In recent years, interest in multicomponent reactions has increased due to their cost-effectiveness, rapidity of synthesis, and high conversion. One of these reactions is the multicomponent Ugi reaction, which involves the interaction of an amine, aldehyde, carboxylic acid, and isocyanide. There are several modifications of this reaction: Ugi-Smiles, Ugi-Diels-Alder, *N*-split-Ugi reaction [2], sacrificial Ugi reaction [3], etc.

Earlier, in our laboratory, compounds were synthesized based on the multicomponent *N*-separated Ugi reaction. It was found that in the case of using aliphatic diamine and formaldehyde, the corresponding aminal is the main by-product. In order to increase the yield of target molecules, it was proposed to use the Ugi reaction with 2-(hydroxymethyl) benzoic acid, which was eliminated during the Mamm rearrangement to form phthalide.

A number of polyamines have been successfully synthesized using aliphatic and cyclic diamines. At the first stage of the synthesis, dibenzylpropanediamine, formaldehyde, 2- (hydroxymethyl) benzoic acid, and commercially available isonitrile were used as starting components. In the second step, the obtained β -aminoamide was reacted with an isonitrile derivative of diglyceride, formaldehyde and 2- (hydroxymethyl) benzoic acid to obtain an unsymmetrical Bis-(β -aminodiamide). The reduction was carried out with phenylsilane in the presence of nickel chloride in high yield.

This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project no. 0706-2020-0019).

References

1. Perevoshchikova K. A. et al. Synthesis of novel lipophilic tetraamines with cytotoxic activity //Mendeleev Communications. – 2019. – Т. 29. – №. 6. – С. 616-618.
2. Pirali T. et al. A concise entry into nonsymmetrical alkyl polyamines //Organic letters. – 2008. – Т. 10. – №. 19. – С. 4199-4202.
3. La Spisa F. et al. An efficient synthesis of symmetric and unsymmetric Bis-(β -aminoamides) via Ugi multicomponent reaction //Organic letters. – 2012. – Т. 14. – №. 23. – С. 6044-6047.

УДК: 619.615.33.576.8 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-67-68

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИН ГИДРОХЛОРИДА

Очиров О.С., Стельмах С.А., Григорьева М.Н., Гаркушева Н.М., Могнонов Д.М., Батоев В.Б.

ФГБУН Байкальский институт природопользования СО РАН, Россия 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, д.б.
e-mail: ochirov.o.s@yandex.ru

Синтезированы N-фенил- и N-октилзамещенные производные полигексаметиленгуанидин гидрохлорида и определена их антимикробная активность по отношению к ВБИ.

Ключевые слова: Полигуанидины, поликонденсация, антимикробная активность.

На сегодняшний день в медицинской практике применяется значительное количество различных дезинфицирующих средств (ДС), имеющих в своем составе вещества синтетического и природного происхождения. Однако рост резистентности микроорганизмов к действию ДС приводит к понижению их эффективности. Наиболее остро эта проблема проявляется в лечебно-профилактических учреждениях в виде внутрибольничных инфекций (ВБИ), поэтому для подавления роста таких штаммов бактерий, традиционно используется ротация ДС [1]. Недостатком такого подхода является наличие бактерий, проявляющих устойчивость ко всем видам ДС, что подтверждается данными мониторинга [2]. Решение данной проблемы возможно путем поиска новых или модификации существующих веществ синтетического или растительного происхождения, обладающих антимикробным действием. Одним из представителей такого класса соединений, являются полигуанидины, характеризующиеся высокой антимикробной активностью, низкой токсичностью, и широко используемые в качестве основного действующего вещества многих ДС [3]. Высокая реакционная способность гуанидиновой группировки открывает широкие возможности модификации полимерной структуры, что, вероятно, окажет положительное влияние на антимикробную активность и безопасность полимеров, получающихся в результате синтеза.

Методом поликонденсации в расплаве были получены N-фенил- и N-октилзамещенные производные полигексаметиленгуанидин гидрохлорида, определены их молекулярно-массовые характеристики, методом ИК-спектроскопии исследовано строение. Установлено, что N-замещенные производные проявляют большее антимикробное действие по сравнению с незамещенным полимером. Наиболее чувствительными ко всем представленным препаратам являются дрожжеподобные грибы *Candida albicans* (полное угнетение), а также метициллин-резистентный *S. aureus*, причем замещенные образцы практически полностью подавляют его рост. Наиболее устойчивыми штаммами являются *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *K. pneumoniae*, процент редукции этих бактерий при действии замещенных образцов не превышает 41%, что объясняется их мультирезистентностью.

Литература

1. Методические рекомендации по применению метода аэрозольной дезинфекции в медицинских организациях. Методические рекомендации. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2015.
2. Шкарин В.В., Саперкин Н.В., Ковалишена О.В. и др. Региональный мониторинг устойчивости микроорганизмов к дезинфектантам: итоги и перспективы // Медицинский альманах. – 2012. – Т.3, №22. – С. 122-125.
3. Воинцева И.И., Гембицкий П.А. Полигуанидины – дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционные материалы. М.: ЛКМ-пресс, 2009.

UDC: 619.615.33.576.8 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-67-69

SYNTHESIS AND STUDY OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF POLYHEXAMETHYLENE GUANIDINE HYDROCHLORIDE DERIVATIVES

Ochirov O.S., Stelmakh S.A., Grigor'eva M.N., Garkusheva N.M., Mogonov D.M., Batoev V.B.

Baikal Institute of Nature Management SB RAS, Ulan-Ude, Russia, 670047, Sahyanovoi str. 6
e-mail: ochirov.o.s@yandex.ru

N-phenyl- and N-octyl-substituted derivatives of polyhexamethylene guanidine hydrochloride were synthesized and their antimicrobial activity against nosocomial infections was determined.

Key words: Polyguanidines, polycondensation, antimicrobial activity.

Today in medical practice, a significant number of various disinfectants are used, which contain substances of synthetic and natural origin. However, an increase in the resistance of microorganisms to the action of DS leads to a decrease in their effectiveness. This problem is most acutely manifested in medical institutions in the form of nosocomial infections (nosocomial infections), therefore, rotation of disinfectants is traditionally used to suppress the growth of such bacterial strains [1]. The disadvantage of this approach is the presence of bacteria showing resistance to all types of disinfectants, which is confirmed by monitoring data [2]. The solution to this problem is possible by searching for new or modifying existing substances of synthetic or plant origin that have antimicrobial action. One of the representatives of this class of compounds are polyguanidines, which are characterized by high antimicrobial activity, low toxicity, and are widely used as the main active ingredient of many disinfectants [3]. The high reactivity of the guanidine group opens up wide possibilities for modifying the polymer structure, which is likely to have a positive effect on the antimicrobial activity and safety of the polymers obtained as a result of the synthesis.

N-phenyl- and N-octyl-substituted derivatives of polyhexamethylene guanidine hydrochloride were obtained by polycondensation in a melt, their molecular weight characteristics were determined, and their structure was investigated by IR spectroscopy. It was found that N-substituted derivatives exhibit a greater antimicrobial effect in comparison with an unsubstituted polymer. The most sensitive to all the drugs presented are the yeast-like fungi *Candida albicans* (complete suppression), as well as methicillin-resistant *S. aureus*, and the substituted samples almost completely suppress its growth. The most resistant strains are *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, and *K. pneumoniae*; the percentage of reduction of these bacteria under the action of substituted samples does not exceed 41%, which is explained by their multi-resistance.

References

1. *Metodicheskie rekomendacii po primeneniju metoda ajerozol'noj dezinfekcii v medicinskih organizacijah. Metodicheskie rekomendacii. M.: Federal'naja sluzhba po nadzoru v sfere zashhity prav potrebitelej i blagopoluchija cheloveka, 2015 (in Russian).*
2. Shkarin V.V., Saperkin N.V., Kovalishena O.V. i dr. *Regional'nyj monitoring ustojchivosti mikroorganizmov k dezinfektantam: itogi i perspektivy // Medicinskij al'manah. – 2012. – V.3, №22. – P. 122-125 (in Russian).*
3. Voinceva I.I., Gembickij P.A. *Poliguanidiny – dezinfekcionnye sredstva i polifunkcional'nye dobavki v kompozicionnye materialy. M.: LKM-press, 2009 (in Russian).*

УДК 579.0 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-68-70

БИОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ БАЙКАЛЬСКИХ АКТИНОБАКТЕРИЙ ПРИ РОСТЕ НА ОТХОДАХ ЛЕСОПИЛЕНИЯ

Переляева Е.В., Краснова М.Е., Моргунова М.М., Бельшенко А.Ю., Тимофеев М.А., Аксенов-Грибанов Д.В.

ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия
664003 г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1
e-mail: cat.perelyaeva@gmail.com

В ходе проведенного исследования показано, что актинобактерии способны как к росту на трудноразлагаемых отходах лесопиления и лигноцеллозе, так и к синтезу биологически активных природных соединений. Это представляет особую ценность для современной биофармацевтики и медицины в части получения новых действующих веществ при разработке лекарственных средств.

Ключевые слова: актинобактерии, биотехнология, биодеструкция, озеро Байкал.

В современном техногенном мире одной из главных проблем является переработка трудноразлагаемых отходов. Одним из перспективных способов их утилизации является биологическая деструкция, с помощью актинобактерий и микроскопических грибов [1, 2]. Данное исследование было направлено на оценку способности актинобактерий синтезировать природные соединения при росте на отходах лесопиления и лигноцеллюлозе. Для культивирования и скрининга природных соединений были отобраны актинобактерии родов *Streptomyces*, *Rhodococcus* и *Microbacterium*.

Выделенные штаммы культивировали на твердой градиентной питательной среде. Для оценки биотехнологического потенциала выделенных актинобактерий использовали подходы высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией и дальнейшую дерепликацию с помощью базой данных Dictionary of Natural Products (CRC - press). В ходе анализа штамма рода *Microbacterium* sp. при культивировании на минимальной среде с добавлением березовых опилок, было обнаружено 7 новых природных соединений. Также, установлено что штамм рода *Rhodococcus* sp. при росте на минимальной среде с добавлением березовых опилок способен к синтезу 5 новых природных соединений. Кроме того, культивирование этого штамма в экспериментальных условиях приводит к синтезу природного соединения, такого как октагидро-7 α -метил-1- (1-метил-2-оксопропил)-5-оксо-1H-инден-4-пропионая кислота. Согласно базе данных DNP, данное соединение обладает противогрибковой активностью.

Дерепликация вторичных метаболитов штамма *Streptomyces* sp. при культивировании на минимальной питательной среде с аргинином и добавлением березовых опилок показала 2 новых природных соединения. Также, было идентифицировано 3 природных соединения: Глациапиррол В - (317,1989 Да), которое, согласно литературным данным, обладает антибиотической активностью; N2- [5-(4-аминофенил)-2,4-пентадиеноил] глутамин (317,1408 Да) и NFAT 133 (276,1717 Да). Последнее соединение обладает противодиабетическим потенциалом.

В результате, было установлено, что питательные среды с добавлением опилок оказывают положительное влияние на синтез новых вторичных метаболитов у актинобактерий. При анализе литературы установлено, что соединение, идентифицированное как Глациапиррол В, относится к пирролсесквитерпеноидам. Также, известно, что оно обладает антибиотической активностью против *Micrococcus luteus* и *Bacillus subtilis* [4]. Соединение, идентифицированное как NFAT 133 является тризамещенным ароматическим соединением, которое ингибирует NFAT-зависимую транскрипцию и обладает антидиабетической активностью [3, 5]. Таким образом, полученные известные и неизвестные соединения представляют особую ценность для современной биофармацевтики и медицины в части получения новых действующих веществ при разработке лекарственных средств.

Работа была выполнена при основной финансовой поддержке гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований 18-29-05051.

Литература

1. Саловарова В.П. Козлов Ю.П. Эколого-биотехнологические основы конверсии растительных субстратов. М.: Издательский дом «Энергия», 2007. – 544 с.
2. Chauhan P. S. Role of various bacterial enzymes in complete depolymerization of lignin: A review//*Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020. Vol .23. P. 1–19.
3. Fermentation, isolation, structure, and antidiabetic activity of NFAT-133 produced by *Streptomyces* strain PM0324667 / A. A. Kulkarni-Almeida [et al.]// *AMB Express*. – 2011. – V. 1. № 42. – P. 42.
4. Glaciapyrroles A, B, and C, Pyrrolsesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. Isolated from an Alaskan Marine Sediment / R. Venkat [et al.]// *Journal of Natural Products*. – 2005. – V. 68. № 5. – P. 780–783.
5. NFAT-133 increases glucose uptake in L6 myotubes by activating AMPK pathway/ C. S. Thakkar [et al.]// *European Journal of Pharmacology*. – 2015. –V. 769. – №15. – P. 117–126.

UDK 579.0 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-68-70

BIOSYNTHETIC POTENTIAL OF BAIKAL ACTINOBACTERIA CULTIVATED ON THE WOODWASHING WASTES

Pereliaeva E.V., Krasnova M.E., Morgunova M.M., Belyshenko A.Y., Timofeyev M.A., Axenov-Gribanov D.V.

Irkutsk State University, Irkutsk, Russia
664003 Irkutsk, Karl Marx St, 1
e-mail. cat.perelyaeva@gmail.com

It has been shown that actinobacteria can grow on hard decomposable wastes and synthesize biologically active metabolites. This is a particular value for modern biopharmaceuticals and medicine in part of drug delivery and study of new natural products.

Key words: actinobacteria, biotechnology, biodegradation, Lake Baikal.

In the modern world, the main problem is the recycling of hard decomposed wastes. One of the promising ways is biological destruction carried out actinobacteria and microscopic fungi [1, 2]. This study aimed to assess the ability of actinobacteria to synthesis natural products under cultivation at sawmill waste. For cultivation and screening natural products were selected actinobacteria *Streptomyces sp.*, *Rhodococcus sp.* and *Microbacterium sp.* genera.

Isolated strains were cultivated on the solid nutrient gradient medium. The biotechnological potential of isolated actinobacteria was evaluated using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry and dereplication analysis with the Dictionary of Natural Products database. Analysis of strains *Microbacterium sp.* cultivated on the minimal medium with addition of birch sawdust presented 7 new natural products. The growth of *Rhodococcus sp.* strain on the minimal medium with addition of birch sawdust provided to the synthesis of 5 new natural products. Also, cultivation of this strain under experimental conditions is leading to the synthesis of the natural compound such as Octahydro-7a-methyl-1-(1-methyl-2-oxopropyl)-5-oxo-1H-indene-4-propanoic acid. According to the DNP database, this compound has antifungal activity.

Dereplication of the secondary metabolites of the strain *Streptomyces sp.* cultivated on the minimal medium with addition of birch sawdust showed two new natural products. To assess the biotechnological potential of the strain *Streptomyces sp.* cultivated on the MM medium with addition of pine sawdust demonstrated 1 new natural compound. Also, we identified 3 natural products: *Glaciapyrrole B*, according to literature data this compound has antibiotic activity; N2-[5-(4-Aminophenyl)-2,4-pentadienoyl] glutamine and NFAT 133.). The last one exhibited antidiabetic props.

As a result, nutrient medium with the addition of sawdust had a positive effect on the synthesis of new natural products by actinobacteria. When analyzing the literature, we found that the compound identified as *Glaciapyrrole B* belongs to pyrrolsesquiterpenoids. It is also known as an antibiotic against *Micrococcus luteus* and *Bacillus subtilis* [4]. The compound identified as NFAT 133 is a trisubstituted aromatic compound that inhibits NFAT-dependent transcription and has antidiabetic activity [3, 5]. Thus, the well-known and unknown compounds are of particular value for modern biopharmaceuticals and medicine in part of drug delivery and study of new natural products.

The study was carried out with the main financial support of the Russian Foundation for Basic Research grant 18-29-05051.

References

1. Salovarova V.P., Kozlov Y.P. *Ecological and biotechnological foundations for the conversion of plant substrates*//M.: Publishing House «Energy», 2007. – 544 с.
2. Chauhan P. S. *Role of various bacterial enzymes in complete depolymerization of lignin: A review*//*Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020. Vol. 23. P. 1–19.
3. *Fermentation, isolation, structure, and antidiabetic activity of NFAT-133 produced by Streptomyces strain PM0324667* / A. A. Kulkarni-Almeida [et al.] // *AMB Express*. – 2011. – V. 1. № 42. – P. 42.
4. *Glaciapyrroles A, B, and C, Pyrrolsesquiterpenes from a Streptomyces sp. Isolated from an Alaskan Marine Sediment* / R. Venkat [et al.] // *Journal of Natural Products*. – 2005. – V. 68. № 5. – P. 780–783.
5. *NFAT-133 increases glucose uptake in L6 myotubes by activating AMPK pathway*/ C. S. Thakkar [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2015. –V. 769. – №15. – P. 117–126.

УДК 616.71-003.93 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-71-72

НОВЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ КОСТНЫЙ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ БЕЛОК-2 (BMP-2): ОСТЕОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ В СОСТАВЕ РАЗЛИЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Попонова М.С., Громов А.В., Карягина А.С.

ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, г. Москва, РФ
123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.18.
e-mail: m.poponova@gmail.com

Новый вариант рекомбинантного костного морфогенетического белка-2 (rhBMP-2) прокариотического происхождения характеризуется высокой активностью *in vitro* и индуцирует выраженный остеогенез *in vitro* в составе различных природных и синтетических материалов.

Ключевые слова: рекомбинантный костный морфогенетический белок-2, BMP-2, остеогенная активность, регенерация костной ткани.

В ряде применяемых в настоящее время материалов содержатся высокие дозы костного морфогенетического белка-2 (BMP-2), что существенно повышает остеоиндуктивность, но может приводить к осложнениям и побочным реакциям. В связи с этим актуально снижение эффективной дозы BMP-2, а также разработка новых носителей для его доставки в место повреждения. Нами был разработан rhBMP-2 прокариотического происхождения, показавший высокую удельную биологическую активность на культуре клеток C2C12 в тесте индукции щелочной фосфатазы. rhBMP-2 показал высокую эффективность *in vitro* на модели краниальных дефектов критического размера на мышцах при совместном применении с природным ксеногенным носителем – деминерализованным костным матриксом из костей крупного рогатого скота [1, 2]. Полученный вариант rhBMP-2 способен к самопроизвольному связыванию с гидроксиллапатитом (ГАП) – основным минеральным компонентом костной ткани. Это свойство использовано при совместном применении с синтетическими пористыми материалами, импрегнированными ГАП: нерезорбируемыми – сверхвысокомолекулярным полиэтиленом (СВМПЭ) и полиэфирэфиркетон (ПЭЭК) и резорбируемыми – полилактидом (PLA) и полигидроксibuтиратом (ПГБ). Во всех случаях в экспериментах *in vitro* на модели краниальных дефектов у мышей остеогенез наблюдался, уже начиная с 3-х недельного срока после имплантации [3, 4]. Через 6 недель в порах имплантатов наблюдалось образование зрелой костной ткани с участками костного мозга. Наибольшее количество костной ткани образовывалось в случае СВМПЭ/ГАП. В случае ПГБ/ГАП на гистологических образцах наблюдались признаки резорбции материала. rhBMP-2 был также исследован в составе сферических микрочастиц из CaCO₃ или кремния, адсорбированных на волокнах ПГБ с восстановленным оксидом графена и без него, и показал высокую биологическую активность [5].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-00133).

Литература

1. Karyagina A.S., Boksha I.S., Grunina T.M., Demidenko A.V. et al. Two variants of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) with additional protein domains: synthesis in an Escherichia coli heterologous expression system//Biochemistry (Moscow). 2017. Vol. 82. P. 613–624.
2. Bartov M.S., Gromov A.V., Manskih V.N., Makarova E.B. et al. Recombinant human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) with additional protein domain synthesized in E. coli: *in vivo* osteoinductivity in experimental models on small and large laboratory animals//Bulletin of experimental biology and medicine. 2017. V. 164. № 2. P. 148–151.
3. Senatov F., Amanbek G., Orlova P., Bartov M. et al. Biomimetic UHMWPE/HA scaffolds with rhBMP-2 and erythropoietin for reconstructive surgery//Materials Science and Engineering: C. Vol. 111. 110750.
4. Chubrik A., Senatov F., Kolesnikov E., Orlova P. et al. Highly porous PEEK and PEEK/HA scaffolds with Escherichia coli-derived recombinant BMP-2 and erythropoietin for enhanced osteogenesis and angiogenesis//Polymer Testing Vol. 87. 106518.
5. Karpov T.E., Peltek O.O., Muslimov A.R., Tarakanchikova Y.V. et al. Development of optimized strategies for growth factor incorporation onto electrospun fibrous scaffolds to promote prolonged release//ACS applied materials & interfaces. Vol.12. № 5. P.5578-5592

УДК 616.71-003.93 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-71-72

NEW RECOMBINANT BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2 (BMP-2): OSTEOGENIC ACTIVITY IN THE COMPOSITION WITH VARIOUS MATERIALS FOR REGENERATIVE MEDICINE

Poponova M.S., Gromov A.V., Karyagina A.S.

*Gamaleya Research Center for Epidemiology and Microbiology, Russian Federation.
123098, Russian Federation, Moscow, Gamalei Str., 18
e-mail: m.poponova@gmail.com*

A new variant of recombinant prokaryotic bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) is characterized by high activity *in vitro* and induces pronounced osteogenesis *in vitro* in the composition with various natural and synthetic materials.

Key words: recombinant bone morphogenetic protein-2, BMP-2, osteogenic activity, bone tissue regeneration.

A number of currently used materials contain high doses of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), which significantly increases osteoinduction, but it can lead to complications and adverse reactions. So it is important to reduce an effective dose of BMP-2, as well as to develop new carriers for its delivery to a site of injury. We have developed rhBMP-2 of prokaryotic origin with high specific biological activity on C2C12 cell culture in an alkaline phosphatase induction test. rhBMP-2 has shown high efficiency *in vitro* in a model of cranial defects of critical size in mice when it used together with a natural xenogenic carrier – demineralized bone matrix from bovine bones [1, 2]. The new rhBMP-2 is capable of spontaneous binding to hydroxylapatite (HA), the main mineral component of bone tissue. This property is the basis of combined usage of rhBMP-2 with different synthetic porous materials impregnated with HA: non-resorbable – Ultra-High Molecular Weight PolyEthylene (UHMWPE) and PolyEtherEtherKetone (PEEK) and resorbable – PolyLactide (PLA) and PolyHydroxyButyrate (PHB). In all cases, in *in vitro* experiments on the model of cranial defects in mice, osteogenesis was observed as early as 3 weeks after implantation [3, 4]. After 6 weeks, the formation of mature bone tissue with bone marrow areas was observed in pores of the implants. The largest amount of bone tissue was formed in the case of UHMWPE/HA. In the case of PHB/HA, the histological samples showed signs of carrier resorption. rhBMP-2 was also investigated in the composition of spherical CaCO₃ or silica microparticles adsorbed on PHB fibers with and without reduced graphene oxide, and demonstrated high biological activity [5].

This work is supported by the Russian Science Foundation (grant no. 16-15-00133).

References

1. Karyagina A.S., Boksha I.S., Grunina T.M., Demidenko A.V. et al. Two variants of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) with additional protein domains: synthesis in an *Escherichia coli* heterologous expression system//*Biochemistry (Moscow)*. 2017. Vol. 82, P. 613–624.
2. Bartov M.S., Gromov A.V., Manskih V.N., Makarova E.B. et al. Recombinant human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) with additional protein domain synthesized in *E. coli*: *in vivo* osteoinductivity in experimental models on small and large laboratory animals//*Bulletin of experimental biology and medicine*. 2017. V. 164. № 2. P. 148–151.
3. Senatov F., Amanbek G., Orlova P., Bartov M. et al. Biomimetic UHMWPE/HA scaffolds with rhBMP-2 and erythropoietin for reconstructive surgery//*Materials Science and Engineering: C*. Vol. 111. 110750.
4. Chubrik A., Senatov F., Kolesnikov E., Orlova P. et al. Highly porous PEEK and PEEK/HA scaffolds with *Escherichia coli*-derived recombinant BMP-2 and erythropoietin for enhanced osteogenesis and angiogenesis//*Polymer Testing* Vol. 87. 106518.
5. Karpov T.E., Peltek O.O., Muslimov A.R., Tarakanchikova Y.V. et al. Development of optimized strategies for growth factor incorporation onto electrospun fibrous scaffolds to promote prolonged release//*ACS applied materials & interfaces*. Vol.12. № 5. P.5578-5592

УДК 606:577.151.5 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-73-74

РАВНОВЕСНЫЕ И КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПРОЦЕССА СОРБЦИИ КОКАРБОКСИЛАЗЫ НА СОРБЕНТАХ РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

Пятизбянцев Т. А., Красовицкая И. А., Котова Н. В.

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия
197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14
e-mail: tim.fivehuts@gmail.com

Рассмотрены равновесные и кинетические параметры процесса сорбции кокарбоксилазы на сорбентах различной структуры. Предложен сорбент для рассмотрения возможности усовершенствования существующей технологии её получения.

Ключевые слова: кокарбоксилаза, кофермент, сорбент.

Кокарбоксилаза (ККБ), тиаминсодержащий кофермент, является известной лекарственной субстанцией, выпускаемой промышленностью преимущественно в форме кокарбоксилазы гидрохлорида (ККГХ). ККГХ широко используется в медицине, назначается как компонент комплексной терапии заболеваний, связанных с нарушением окислительного и неокислительного декарбоксилирования α -кетокислот и обмена α -кетосахаров в организме человека.

Традиционная технология производства ККГХ включает применение метода сорбционной очистки раствора целевого продукта на сорбенте КУ-23 [1]. В настоящее время данная технология характеризуется малым выходом целевого продукта, поэтому актуальной является разработка более совершенных сорбционных методов выделения и очистки кокарбоксилазы [2].

В данной работе был изучен ряд сорбентов, различающихся по составу и функциональным свойствам, в него входили: катиониты (КУ-23, Macronet MN-500, Purolite C-115E, Doshion DVC-8 UPS, Dowex Marathon C, Purolite C400 MB, Amberlite HPR1100, Purolite C150H, Purolite C160H), аниониты (Purolite A100, Purolite A847), молекулярный сорбент (Macronet MN-202) и хелатообразующий сорбент (Macronet S950). Для определения оптимальных условий проведения процесса сорбции были осуществлены подборы pH раствора ККБ и концентрации данных сорбентов в растворе. Было показано, что максимальное значение емкости сорбции вышеперечисленных сорбентов наблюдается при pH=0 и концентрации сорбента в растворе 2 мг/мл. Проведены исследования по изучению равновесных и кинетических параметров процесса сорбции. Показано, что изотермы сорбции ККБ имеют различный вид: Ленгмюра, БЭТ и кооперативная. Определена максимальная ёмкость каждого из исследуемых сорбентов (Q_{max}), а также рассчитаны коэффициенты распределения (K_d) и коэффициенты диффузии (D) с учетом кинетических кривых. По результатам экспериментов были отобраны три наиболее перспективных сорбента: сульфокатионит Macronet MN-500, сильноокислотный катионит Amberlite HPR1100 и хелатный сорбент Purolite S950. Экспериментальные и расчётные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Экспериментальная характеристика сорбентов при сорбции кокарбоксилазы

| Сорбент | Q_{max} , мг/мл | K_d , мл/г | D , м ² /с |
|----------|-------------------|--------------|--------------------------------|
| S950 | 963,10 ± 48,2 | 96,67 ± 0,5 | $(4,4 \pm 0,2) \times 10^{-6}$ |
| MN-500 | 1364,31 ± 68,2 | 136,46 ± 0,5 | $(3,0 \pm 0,2) \times 10^{-7}$ |
| HPR 1100 | 1420,24 ± 71,0 | 156,95 ± 0,5 | $(1,4 \pm 0,2) \times 10^{-6}$ |

Из таблицы видно, что для сорбентов: Purolite S950, Macronet MN-500 и Amberlite HPR1100 - характерны высокие ёмкость, скорость и избирательность сорбции.

Таким образом, данные сорбенты являются перспективными для разработки сорбционно-хроматографического метода выделения кокарбоксилазы.

Литература

1. Поляченко В.М., Юркевич А.М., Махкамов Х.М., Леонтьева Л.И., Ядгаров Э.Г. Способ получения фосфорных эфиров тиамин // Патент РФ № 2041229, 09.08.1995
2. Krummradt Holger, Beschmann Klaus, Wartenberg Frank-Hardi, Diekmann Horst Method of purifying thiamine phosphates// United States Patent № US 6596865 B1, 22.07.2003

UDC 606:577.151.5 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-73-74

EQUILIBRIUM AND KINETIC PARAMETERS OF COCARBOXYLASE SORPTION PROCESS ON SORBENTS OF DIFFERENT STRUCTURE

Pyatiizbyantsev T.A., Krasovitskaya I.A., Kotova N.V.

Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia
197376, St. Petersburg, Professor Popov str., 14
e-mail: tim.fivehuts@gmail.com

Equilibrium and kinetic parameters of cocarboxylase sorption process on different structure sorbents are considered. The sorbent is proposed to consider the possibility of improving its production existing technology.

Key words: cocarboxylase, coenzyme, sorbent.

Cocarboxylase (CCB), a thiamine-containing coenzyme, is a well-known medicinal substance produced by the industry primarily in the form of cocarboxylase hydrochloride (CCHC). CCHC is widely used in medicine, and is prescribed as a component of the complex treatment of diseases associated with violation of the α -ketoacids oxidative and non-oxidative decarboxylation and metabolism of α -ketosaccharides in the human body.

The traditional technology of CCHC production includes the target product solution on the sorbent CU-23 sorption cleaning method application [1]. Nowadays this technology is characterized by low yield of the target product, therefore, the development of more advanced sorption methods for the isolation and purification of cocarboxylase is relevant [2].

In this work has been studied a number of sorbents differing in composition and functional characteristics, it consisted of: cation exchange sorbents (CU-23, Macronet MN-500, Purolite C-115E, Doshion DVC-8 UPS, Dowex Marathon C, Purolite C400 MB, Amberlite HPR1100, Purolite C150H, Purolite C160H), anion exchange sorbents (Purolite A100, Purolite A847), molecular sorbents (Macronet MN-202) и chelating sorbents (Macronet S950). To determine the optimal conditions of the sorption process, the selection of pH of the CCB solution and the concentration of these sorbents in the solution were carried out. It was shown that the maximum value of sorption capacity of the above sorbents was observed at pH=0 and sorbent concentration in the solution of 2 mg/ml. Research on equilibrium and kinetic parameters of the sorption process has been carried out. It is shown that the sorption isotherms of the CCB have different types: Langmuir, BET and cooperative. The maximum capacity of each of the studied sorbents (Q_{max}) was determined and the distribution coefficients (K_d) and diffusion coefficients (D) were calculated taking into account kinetic curves. Three most promising sorbents were selected based on experiments results: Macronet MN-500 sulfocation exchange sorbent, Amberlite HPR1100 strong acid cation exchange sorbent and Purolite S950 chelate sorbent. Experimental and design data are presented in Table 1.

Table 1. Experimental characterization of sorbents in cocarboxylase sorption

| Sorbent | Q_{max} , mg/ml | K_d , ml/g | D , m^2/sec |
|----------|--------------------|------------------|--------------------------------|
| S950 | $963,10 \pm 48,2$ | $96,67 \pm 0,5$ | $(4,4 \pm 0,2) \times 10^{-6}$ |
| MN-500 | $1364,31 \pm 68,2$ | $136,46 \pm 0,5$ | $(3,0 \pm 0,2) \times 10^{-7}$ |
| HPR 1100 | $1420,24 \pm 71,0$ | $156,95 \pm 0,5$ | $(1,4 \pm 0,2) \times 10^{-6}$ |

The table shows that sorbents: Purolite S950, Macronet MN-500 and Amberlite HPR1100 are characterized by high capacity, speed and selectivity of sorption.

Thus, these sorbents are promising for the development of a sorption-chromatographic method for the isolation of cocarboxylase.

References

1. Polyachenko V.M., Yurkevich A.M., Makhkamov H.M., Leontyeva L.I., Yadgarov E.G. A process for preparing phosphoric esters thiamine // Patent of Russian Federation № 2041229, 09.08.1995
2. Krummradt Holger, Beschmann Klaus, Wartenberg Frank-Hardi, Diekmann Horst Method of purifying thiamine phosphates// United States Patent № US 6596865 B1, 22.07.2003

УДК 579.66 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-75-76

ПОДБОР СУБСТРАТОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАКРОМИЦЕТОВ *PLEUROTUS OSTREATUS*, *PLEUROTUS ERYNGII* И *GANODERMA LUCIDUM*

Романенко М.Н.¹, Мирошниченко М.И.¹, Ивасенко Д.А.^{1,2}, Анциферов Д.В.², Глухова Л.Б.^{1,2}, Франк Ю.А.^{1,2}

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Биологический институт, Россия, 634050, Томск, пр. Ленина, д. 36

² ООО «Дарвин», Россия, 634040, Томск, ул. Высоцкого, д.28, стр. 3
e-mail: bio.darwin@mail.ru

Определены удельные скорости роста мицелия *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* и *Ganoderma lucidum* на разных питательных средах. На основании полученных данных выбраны оптимальные субстраты для дальнейшего получения искусственной кожи и создания строительных биоматериалов с использованием мицелия грибов.

Ключевые слова: биоматериалы; *Pleurotus ostreatus*; *Pleurotus eryngii*; *Ganoderma lucidum*; искусственная кожа; строительные материалы; скорость роста; питательные среды.

Сокращение отрицательного антропогенного влияния и минимизация отходов являются одними из самых актуальных проблем в экологии производства и потребления. Традиционные технологии изготовления строительных материалов, как и кожевенная промышленность, оказывают негативное влияние на окружающую среду, в основном за счет выбросов парниковых газов в процессе производства [1], [2] и больших расходов пресной воды [3], [4]. Создание различных материалов на основе мицелия грибов также перспективно с точки зрения их биоразлагаемости и безопасности для человека.

Для разработки искусственной кожи из грибного мицелия были выбраны макромицеты *Ganoderma lucidum* и *Pleurotus eryngii*. Была поставлена задача по поиску оптимальных субстратов для культивирования для данных видов грибов в стационарной культуре при 26 °С. Культивирование осуществляли на четырех твердых питательных средах: среда Чапека (СА) с добавлением дрожжевого экстракта, сусловый агар (WA), картофельно-глюкозный агар (PDA) и агар с солодовым экстрактом и глюкозой (МЕА). Удельную скорость роста измеряли по линейному увеличению диаметра колоний в единицу времени. Наибольшую скорость роста мицелия *G. lucidum* наблюдали на двух питательных средах – МЕА (0.74 мм/ч) и PDA (0.75 мм/ч). Разница в скорости роста *P. eryngii* на исследуемых средах не превышала 0.05 мм/ч.

Для создания строительных биоматериалов обрабатывали рост *Ganoderma lucidum* и *Pleurotus ostreatus* в стационарной культуре при 26°С на твердых субстратах. Скорость роста также измеряли по линейному увеличению диаметра колоний после инокуляции зернового мицелия на пяти различных субстратах: рапсовый шрот, отходы рапса и овса («отсев»), сосновые и березовые опилки. Влажность субстратов доводили до 60% и добавляли 3% карбоната кальция. Для *G. lucidum* наибольшую скорость наблюдали на отходах овса и рапса (0.57 и 0.41 мм/ч, соответственно). У *P. ostreatus* самый быстрый рост зафиксирован на отходах овса (0.57 мм/ч).

Согласно результатам эксперимента и учитывая экономические соображения оптимальной средой для получения искусственной кожи на жидких питательных средах с использованием *G. lucidum* и *P. eryngii* был выбран картофельно-глюкозный агар (PDA). Отходы овса и рапса являются перспективными субстратами для разработки технологии создания строительных биоматериалов с помощью *G. lucidum* и *P. ostreatus*.

Литература

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) // <http://www.fao.org/3/a-i6345e.pdf> (дата обращения: 19.09.2020)
2. Berge B. *The Ecology of Building Materials, Second Edition*. Oxfordshire: taylor & francis, 2009. 447 p.
3. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *Water use in livestock production systems and supply chains – Guidelines for assessment*, 2019. 130 p.
4. Erickson Brownell B. *Examining the Environmental Impacts of Materials and Buildings*. PA.: IGI Global, 2020. 383 p.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-75-76

SELECTION OF GROWTH SUBSTRATES FOR DEVELOPMENT NEW BIOMATERIALS USING MACROMYCETES *PLEUROTUS OSTREATUS*, *PLEUROTUS ERYNGII* AND *GANODERMA LUCIDUM*

Romanenko M.N.¹, Miroshnichenko M.I.¹, Ivashenko D.A.^{1,2}, Antsiferov D.V.², Glukhova L.B.^{1,2}, Frank Y.A.^{1,2}

¹ National Research Tomsk State University, Biological Institute, Tomsk, Russia, 634050, Lenina Ave., 36

² Darwin LLC, Russia, 634040, Tomsk, Vysotskogo Str., 28/3

e-mail: bio.darwin@mail.ru

The specific growth rates of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* and *Ganoderma lucidum* were determined on different culture media. Based on the data obtained, the optimal substrates were selected for the further production of artificial leather and construction biomaterials using fungal mycelium.

Ключевые слова: biomaterials; *Pleurotus ostreatus*; *Pleurotus eryngii*; *Ganoderma lucidum*; artificial leather; construction materials; growth rate; culture media.

Reducing the negative anthropogenic impact and minimizing waste are among the most relevant problems in the ecology of production and consumption. Traditional technologies for the manufacture of construction materials, as well as the leather industry, have a negative impact on the environment, mainly due to greenhouse gas emissions in the production process [1], [2] and high consumption of fresh water [3], [4]. Development of various materials based on the mycelium of fungi is also promising both in terms of their biodegradability and safety for humans.

Macromycetes *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus eryngii* were selected to develop artificial leather from fungal mycelium. The task was to search the optimal substrates for cultivation of these types of fungi in the stationary culture at 26°C. The cultivation was carried out on four solid culture media: Czapek agar medium (CA) with the addition of yeast extract, wort agar (WA), potato-glucose agar (PDA), and malt extract glucose agar (MEA). The specific growth rate was measured by the linear increase in the diameter of the colonies. The highest growth rate of *G. lucidum* mycelium was observed on two culture media, MEA (0.74 mm h⁻¹) and PDA (0.75 mm h⁻¹); the difference in growth rates on various media for *P. eryngii* did not exceed 0.05 mm h⁻¹.

To create construction biomaterials, the growth of *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus ostreatus* on solid substrates was tested in the stationary culture at 26°C. Growth rate was also measured by the linear increase in the diameter of the colonies after inoculation of grain mycelium in five different substrates: rapeseed meal, rapeseed and oat grain waste, pine and birch sawdust. The moisture content of the substrates was adjusted to 60% and 3% calcium carbonate was added. For *G. lucidum*, the highest rate was observed on waste of oats and rapeseed grains (0.57 and 0.41 mm h⁻¹, respectively). For *P. ostreatus*, the fastest growth was recorded on oats waste (0.57 mm h⁻¹).

According to the results of the experiment and taking into account economic considerations, the optimal medium for *G. lucidum* and *P. eryngii* was chosen potato-glucose agar (PDA) for the further obtaining artificial leather on liquid culture media. Oats and rapeseed grain waste are promising substrates for the development of technology for creating construction biomaterials using *G. lucidum* and *P. ostreatus*.

References

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) // <http://www.fao.org/3/a-i6345e.pdf> (дата обращения: 19.09.2020)
2. Berge B. *The Ecology of Building Materials, Second Edition*. Oxfordshire: Taylor & Francis, 2009. 447 p.
3. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *Water use in livestock production systems and supply chains – Guidelines for assessment*, 2019. 130 p.
4. Erickson Brownell B. *Examining the Environmental Impacts of Materials and Buildings*. PA.: IGI Global, 2020. 383 p.

УДК: 577.115.7, ББК: 28.070 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-77-78

ЭКЗОСОМЫ МОЛОКА ЛОШАДИ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СРЕДСТВА АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ

С.Е.Седых, А.Е.Кулешова, Г.А.Невинский

ИХБФМ СО РАН, Россия, 630090, Новосибирск, Лаврентьева, 8, e-mail: sedyh@niboch.nsc.ru, 89137271000

Экзосомы – внеклеточные везикулы диаметром 40-100 нм. Экзосомы обнаружены во многих биологических жидкостях, в том числе в молоке. Молоко является уникальным источником экзосом, так как сбор этой биологической жидкости неинвазивный, животные могут давать несколько литров молока в сутки. Молоко коровы не может быть использовано для получения биологически активных компонентов с терапевтическим потенциалом из-за риска передачи прионных заболеваний. В связи с этим, молоко лошади является уникальным источником экзосом, которые могут быть использованы для адресной доставки.

Ключевые слова: молоко, экзосомы, лошадь, адресная доставка

Клетки многоклеточного организма сообщаются между собой множеством различных способов, среди которых особое место занимает передача сигнала с помощью везикул. Внеклеточные везикулы секретируются всеми типами клеток во внеклеточное пространство и доставляют свое содержимое к клеткам-реципиентам. На сегодняшний день одной из групп внеклеточных везикул, представляющей особенный интерес для изучения, являются экзосомы – мембранные везикулы с диаметром 40–100 нм. Экзосомы секретируются клетками и обнаружены в различных биологических жидкостях – крови, слезах, слюне, моче, спинномозговой жидкости, молоке. Экзосомы не только обеспечивают адресную доставку молекулярных сигналов клеткам-реципиентам, но и несут уникальные маркеры клетки-продуцента. В связи с этим, экзосомы – являются многообещающими средствами адресной доставки терапевтических нуклеиновых кислот и лекарственных препаратов в клетки пациента.

Методы выделения экзосом, описанные в научной литературе, обычно приводят к получению недостаточно очищенных препаратов, особенно это касается экзосом, выделенных из молока. В литературе описаны сотни и тысячи белков, а также тысячи нуклеиновых кислот, экстрагированных из недостаточно хорошо очищенных препаратов. Нами разработан способ выделения экзосом из молока и других биологических образцов, который включает стадию гель-фильтрации. Гель-фильтрация позволяет отделить препарат везикул от фрагментов клеточных мембран, белков и их комплексов, совыделяющихся при ультрацентрифугировании. Полученные препараты содержат значительно меньше белков и нуклеиновых кислот, чем после ультрацентрифугирования.

Сравнение состава белков и нуклеиновых кислот, а также биологической активности препаратов экзосом до и после гель-фильтрации позволяет оценить терапевтический потенциал везикул без совыделяющихся примесей. Полученные нами данные указывают на значительное изменение биологической активности препаратов экзосом после удаления белковых примесей, при котором сохраняется и в некоторых случаях даже увеличивается потенциал их использования в качестве средств адресной доставки.

Препараты экзосом молока лошади, полученные ультрацентрифугированием, после дополнительной очистки гель-фильтрацией пригодны для адресной доставки терапевтических нуклеиновых кислот и белков в клетки.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФИ 18-74-10055.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-77-78

HORSE MILK EXOSOMES – PERSPECTIVE AGENTS FOR TARGET DELIVERY

S.Sedykh, A.Kuleshova, G.Nevinsky

SB RAS ICBFM, Russia, 630090, Novosibirsk, Lavrentieva ave, 8

Exosomes are extracellular vesicles with a diameter of 40-100 nm. Exosomes are found in many body fluids, including milk. Milk is a unique source of exosomes since the collection of this biological fluid is non-invasive, and animals can produce several liters of milk per day. Cow's milk cannot be used to isolate biologically active

components with therapeutic potential due to the risk of transmission of prion diseases. In this regard, horse milk is a unique source of exosomes that can be used for targeted delivery.

Key words: milk, exosomes, horse, target delivery

Cells in organism communicate with each other in many different ways, among which a special place is vesical transport. Extracellular vesicles are secreted by all types of cells into the extracellular space and deliver their contents to the recipient cells. One of the groups of extracellular vesicles that is of particular interest to study are exosomes – membrane vesicles with a diameter of 40–100 nm. Exosomes are secreted by cells and are found in various biological fluids: blood, tears, saliva, urine, cerebrospinal fluid, and milk. Exosomes provide targeted delivery of molecular signals to recipient cells, but also carry unique markers of the maternal cell. In this regard, exosomes are promising agents for targeted delivery of therapeutic nucleic acids and drugs to the patient's cells.

Exosome isolation methods described in the scientific literature usually result in insufficiently purified vesicles, especially in case of milk derived exosomes. There are described hundreds and thousands of proteins, as well as thousands of nucleic acids extracted from insufficiently purified preparations. We have developed a method for isolating exosomes from milk and other biological samples, which includes the stage of gel filtration. Gel filtration allows to separate the vesicles from the fragments of cell membranes, proteins and their complexes, which are co-isolating during ultracentrifugation. The resulting preparations contain significantly less proteins and nucleic acids than after ultracentrifugation.

Comparison of the composition of proteins and nucleic acids, as well as the biological activity of exosome preparations before and after gel filtration, allows to evaluate the therapeutic potential of vesicles without co-isolating contaminants. Our data indicate a significant change in the biological activity of exosome preparations after removal of protein impurities, which preserves and, in some cases, even increases the potential for their use as targeted delivery vehicles.

Horse milk exosome preparations, obtained with ultracentrifugation, after additional purification by gel filtration, are suitable for targeted delivery of therapeutic nucleic acids and proteins to cells.

Grant: The research supported with RSF project 18-74-10055.

УДК 577.114 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-78-81

ВЛИЯНИЕ АЭРАЦИИ НА СТЕПЕНЬ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ

А.Е. Ситникова^{1,2}, Н.А. Шавыркина^{1,2}, В.В. Будаева¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Бийск, Россия
659322, г. Бийск, Алтайский край, ул. Социалистическая, 1

² Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», Бийск, Россия
659305, г. Бийск, Алтайский край, ул. им. Героя Советского Союза Трофимова, 27
e-mail: sitnikova97.97@mail.ru

Установлено неоднозначное влияние принудительной аэрации в объемах: 3,3; 6,3; 9,2; 12,3; 16,7 л/мин на степень полимеризации бактериальной наноцеллюлозы.

Ключевые слова: бактериальная наноцеллюлоза, *Medusomyces gisevii* Sa-12, аэрация, степень полимеризации

Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) идентична растительной целлюлозе по химической формуле. В то же время, БНЦ превосходит растительную целлюлозу по некоторым физико-химическим характеристикам: БНЦ обладает высокой механической прочностью и степенью чистоты, пористостью, влагоудерживающей способностью, имеет более высокую степень кристалличности, является биосовместимой с тканями человеческого организма [1]. Эти свойства сделали БНЦ подходящим биомедицинским и промышленным материалом для имплантатов, мембранных фильтров [2], искусственной кожи и тканей [3].

Ранее проведенные исследования влияния аэрации на потребление редуцирующих веществ и выход БНЦ показали, что в диапазоне интенсивности 0,0-3,3 л/мин изменения контролируемых параметров отсутствуют [4]. Но степень полимеризации (СП) БНЦ является ключевой характеристикой [5], поэтому целью данного исследования являлось определение влияния аэрации на СП БНЦ.

Процесс культивирования БНЦ был проведен на полусинтетической питательной среде симбиотической культурой *Medusomyces gisevii* SA-12, в климатической камере, при постоянной температуре 27 °С, в статических условиях, с постоянной подачей воздуха 3,3; 6,3; 9,2; 12,3 и 16,7 л/мин. Контрольным образцом являлся образец, культивированный без принудительной аэрации.

Определение СП образцов БНЦ проводили вискозиметрическим методом с использованием в качестве растворителя кадоксена [5], результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1. Влияние аэрации на СП БНЦ в процессе культивирования

| Продолжительность культивирования, сутки | Степень полимеризации | | | | | |
|--|-----------------------|------|------|------|------|------|
| | Расход воздуха, л/мин | | | | | |
| | Контроль | 3,3 | 6,3 | 9,2 | 12,3 | 16,7 |
| 7 | 2000 | 3150 | 2450 | 2500 | 1400 | 2500 |
| 14 | 2700 | 2600 | 3350 | 2650 | 1850 | 2750 |
| 21 | 2250 | 2900 | 3100 | 2850 | 2600 | 2800 |

Исходя из полученных данных, наблюдается сложная динамика влияния аэрации на СП. Только в одном эксперименте с аэрацией объемом 6,3 л/мин наблюдается сходство с контролем с максимумом на 14-е сутки, в других случаях СП постоянно и постепенно увеличивается в процессе культивирования, что свидетельствует о положительном влиянии аэрации. Сравнение значений СП с контрольными также показывает аналогичный характер влияния, за исключением эксперимента с аэрацией объемом 12,3 л/мин. Увеличение СП является, вероятно, следствием активизации метаболической деятельности непосредственных продуцентов БНЦ – облигатных аэробных уксуснокислых бактерий. Исследования необходимо продолжить.

Исследования проведены при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск). Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054).

Литература

1. Abol-Fotouh D., Hassan M.A., Shokry H., Roig A., Azab M.S., Kashyout Abd El-Hady B. Bacterial nanocellulose from agro-industrial wastes: low-cost and enhanced production by *Komagataeibacter saccharivorans* MD1 // *Scientific Reports*. – 2020. – 10:3491. DOI: 10.1038/s41598-020-60315-9.
2. Sijabat E.K., Nuruddin A., Aditiawati P., Purwasasmita B.S. Optimization on the synthesis of bacterial nanocellulose (BNC) from banana peel waste for water filter membrane applications // *Materials Research Express*. – 2020. – Vol.7, №5. – P 1-10.
3. Sajjad W., Khan T., Ul-Islam M., Khan R., Hussain Z., Khalid A., Wahid F. Development of modified montmorillonite-bacterial cellulose nanocomposites as a novel substitute for burn skin and tissue regeneration // *Carbohydrate Polymers*. – 2019. – Vol. 206. – P. 548-556.
4. Sitnikova A.E., Gladysheva E.K., Skiba E.A., Budaeva V.V., Shavyrkina N.A. Aeration effect on cultivation efficiency of bacterial nanocellulose / *Biotechnology: state of the art and perspectives: the proceedings of International congress, February 25-27, 2019, Moscow*. – Moscow: LLC «RED GROUP». – P. 76-77.
5. Skiba E.A., Baibakova O.V., Gladysheva E.K., Budaeva V.V. Study of the influence of *Medusomyces gisevii* Sa-12 inoculum dosage on bacterial cellulose yield and degree of polymerization / *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya [Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology]*. 2019, vol. 9, no. 3, P. 420–429. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2019-9-3-420-429.

UDC 577.114 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-78-81

AERATION EFFECT ON BACTERIAL NANOCELLULOSE DEGREE OF POLYMERIZATION

A.E. Sitnikova^{1,2}, N.A. Shavyrkina^{1,2}, V.V. Budaeva¹

¹ Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Siberian Branch of the Russian Academy of Science (IPCET SB RAS), Biysk, Russia

659322, Biysk, Altai Krai, ul. Sotsialisticheskaya 1

² Biysk Technological Institute, Polzunov Altai State Technical University, Biysk Russia

659305, Biysk, Altai Krai, ul. Trofimova 27

e-mail: sitnikova97.97@mail.ru

The forced aeration at flow rates of 3.3, 6.3, 9.2, 12.3 and 16.7 L/min was found to have an ambiguous effect on the degree of polymerization of bacterial nanocellulose.

Key words: bacterial nanocellulose, *Medusomyces gisevii* Sa-12, aeration, degree of polymerization

Bacterial nanocellulose (BNC) and plant cellulose are alike in chemical formula. Meanwhile, BNC is superior in some physicochemical properties to plant cellulose: BNC exhibits high mechanical strength and purity, porosity, water-holding capacity, has a higher crystallinity index, and is biocompatible with human tissues [1]. These properties made BNC a suitable biomedical and industrial material for implants, water filter membranes [2], artificial skin and tissue regeneration [3].

Previous studies on how aeration influences reducing sugar consumption and BNC yield demonstrated no variation in controlled parameters at an aeration rate of 0.0-3.3 L/min [4]. But, the BNC degree of polymerization (DP) is a key characteristic [5]; therefore, the present study aimed to determine how aeration would affect the BNC DP.

BNC was cultivated on a semisynthetic nutrient medium by using the *Medusomyces gisevii* SA-12 symbiotic culture in a climate chamber at a constant temperature of 27 °C under static conditions with steady air flowrates of 3.3, 6.3, 9.2, 12.3 and 16.7 L/min. A sample cultured without forced aeration was the control.

The degree of polymerization of BNC samples was measured on a viscometer using cadoxene as solvent [5]; the results are summarized in Table 1.

Table 1. Aeration effect on BNC DP during the culture process

| Culture time, days | Degree of polymerization | | | | | |
|--------------------|--------------------------|------|------|------|------|------|
| | Air flowrate, L/min | | | | | |
| | Control | 3.3 | 6.3 | 9.2 | 12.3 | 16.7 |
| 7 | 2000 | 3150 | 2450 | 2500 | 1400 | 2500 |
| 14 | 2700 | 2600 | 3350 | 2650 | 1850 | 2750 |
| 21 | 2250 | 2900 | 3100 | 2850 | 2600 | 2800 |

It follows from the obtained data that the dynamics of the aeration effect on DP is complicated. Only one experiment with an aeration rate of 6.3 L/min was observed to be similar to the control with a maximum at 14 days; in other cases, DP increased steadily and gradually during the culture process, suggesting a positive impact of aeration. The comparison of DP values with the control also showed a similar nature of the aeration effect, except for the 12.3 L/min aeration rate experiment. The increase in DP ensues likely from the activated metabolism of direct BNC producers—obligate aerobic acetic bacteria. The research has to be continued.

The research was performed using instruments provided by the Biysk Regional Center for Shared Use of Scientific Equipment of the SB RAS (IPCET SB RAS, Biysk). The research was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 17-19-01054).

References

- Abol-Fotouh D., Hassan M.A., Shokry H., Roig A., Azab M.S., Kashyout Abd El-Hady B. Bacterial nanocellulose from agro-industrial wastes: low-cost and enhanced production by *Komagataeibacter saccharivorans* MD1 // *Scientific Reports*. – 2020. – 10:3491. DOI: 10.1038/s41598-020-60315-9.
- Sijabat E.K., Nuruddin A., Aditiawati P., Purwasasmita B.S. Optimization on the synthesis of bacterial nanocellulose (BNC) from banana peel waste for water filter membrane applications // *Materials Research Express*. – 2020. – Vol.7, №5. – P 1-10.

3. Sajjad W., Khan T., Ul-Islam M., Khan R., Hussain Z., Khalid A., Wahid F. Development of modified montmorillonite-bacterial cellulose nanocomposites as a novel substitute for burn skin and tissue regeneration // *Carbohydrate Polymers*. – 2019. – Vol. 206. – P. 548-556.
4. Sitnikova A.E., Gladysheva E.K., Skiba E.A., Budaeva V.V., Shavyrkina N.A. Aeration effect on cultivation efficiency of bacterial nanocellulose / *Biotechnology: state of the art and perspectives: the proceedings of International congress, February 25-27, 2019, Moscow*. – Moscow: LLC «RED GROUP». – P. 76-77.
5. Skiba E.A., Baibakova O.V., Gladysheva E.K., Budaeva V.V. Study of the influence of *Medusomyces gisevii* Sa-12 inoculum dosage on bacterial cellulose yield and degree of polymerization / *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya [Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology]*. 2019, vol. 9, no. 3, P. 420–429. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2019-9-3-420-429.

УДК 632.9 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-81-83

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ WAMP ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫХ СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Слезина М.П.¹, Истомина Е.А.¹, Коростылева Т.В.¹, Щербакова Л.А.², Одинцова Т.И.¹

¹ ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия
119991, Москва, ул. Губкина, д.3

² ФГБУН ВНИИ фитопатологии, Московская обл., Россия
143050, Московская обл., Одинцовский р-н, Большие Вяземы, ул. Институт, вл.5
e-mail: omey@list.ru

Анализ взаимосвязи между структурой и функцией гевиноподобных антимикробных пептидов WAMP послужит теоретической базой для разработки новых биопестицидов и прототипов лекарственных препаратов на основе более простых по структуре производных пептида WAMP.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, пшеница, детерминанты антифунгальной активности.

Антимикробные пептиды (АМП) – важнейшие компоненты системы врожденного иммунитета растений и животных. Исследование АМП является чрезвычайно актуальным для разработки новых экологически безопасных средств борьбы с патогенами растений, а также для создания лекарственных препаратов нового поколения при лечении инфекционных заболеваний человека и животных. В настоящее время одним из лимитирующих факторов, препятствующих практическому использованию АМП, является высокая стоимость их производства. В связи с этим, поиск коротких производных АМП, сохраняющих высокую биологическую активность, является актуальной задачей.

Настоящая работа посвящена структурно-функциональной характеристике гевиноподобных АМП пшеницы семейства WAMP, являющихся эффективными ингибиторами секретрируемых металлопротеиназ фитопатогенов. Цель работы состояла в выяснении роли отдельных участков молекулы пептида WAMP в антимикробной активности. Для выявления детерминант антимикробной активности в молекуле пептида WAMP пшеницы методом химического синтеза были получены пептиды, соответствующие центральному фрагменту молекулы (G1: LCCGKYGFCGSG, G2: CCGKYGFCGSGDAYC), а также последовательностям N- и C-концевых участков молекулы пептида (N1: AQRCDQARGAKC и C1: GKGSCQSQRGCR).

Изоэлектрическая точка у всех пептидов, кроме G2, больше 7. Все пептиды, кроме G2, положительно заряжены. Алифатический индекс варьирует от 6,67 до 32,5, и только у C1 он равен 0. Индекс Боумана близок к 0 у пептидов G1 и G2. Индекс нестабильности больше 40 лишь у C1. У всех пептидов, кроме N1, предсказано наличие антимикробной и противоопухолевой активностей. По данным молекулярного моделирования концевые пептиды N1 и C1 обладают сходной пространственной структурой, в которой половина аминокислотных остатков вовлечена в образование α -спирали, причем у обоих пептидов она расположена в C-концевой области молекулы. Пептид G1 содержит 2 антипараллельных тяжа β -структуры. Структура G2 представляет собой неупорядоченный клубок, однако, вероятно образование одной дисульфидной связи между остатками цистеина Cys2 и Cys15. Распределение полярных и неполярных остатков во всех пептидах неравномерное, что характерно для АМП.

Тестирование антифунгальной активности *in vitro* методом проращивания спор в тонком слое агар в отношении 7 фитопатогенных грибов: *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Bipolaris sorokiniana*, *Cladosporium cucumerinum*, *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum* и *F. avenaceum*, показало, что пептид C1 эффективно ингибирует

прорастание спор *C. cucumerinum* и обоих видов *Alternaria*. Пептид G1 ингибировал прорастание спор *B. sorokiniana*, и слабо – *F. culmorum*. В отношении других грибов пептид G1 был неактивен. Пептид N1 тормозил прорастание спор *F. culmorum*. Таким образом, установлено, что концевые участки молекулы WAMP проявляют большую ингибирующую активность в отношении исследованных патогенов, чем центральный участок молекулы. При этом в отношении отдельных патогенов активность некоторых пептидов была выше, чем интактного WAMP. Полученные результаты свидетельствуют о том, короткие 13-членные пептиды, соответствующие N- и C-концевым участкам молекулы пептида WAMP, могут быть использованы для разработки биопестицидов для борьбы с опасными заболеваниями растений.

Работа выполнена за счет средств гранта РФФИ №19-016-00069.

UDK 632.9 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-81-83

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF WAMP ANTIMICROBIAL PEPTIDES FOR THE DEVELOPMENT OF NEW ENVIRONMENTALLY FRIENDLY PLANT PROTECTION AGENTS

Slezina M.P.¹, Istomina E.A.¹, Korostyleva T.V.¹, Scherbakova L.A.², Odintsova T.I.¹

¹ Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119991, Moscow, Gubkina str. 3

² All-Russian Research Institute of Phytopathology, Moscow Reg., Russia
143050, B. Vyazyomy, Moscow Reg., Institute str. 5
e-mail: omey@list.ru

Analysis of the relationship between the structure and function of hevein-like antimicrobial WAMP peptides will serve as a theoretical basis for the development of new biopesticides and drug prototypes based on simpler WAMP derivatives.

Key words: antimicrobial peptides, wheat, determinants of antimicrobial activity

Antimicrobial peptides (AMPs) are the most important components of the plant and animal innate immune system. The study of AMPs is extremely important for the development of novel environmentally safe plant protection measures, as well as for the creation of next-generation drugs for the treatment of infectious diseases of humans and animals. Currently, one of the limiting factors that prevent the practical use of AMPs is high production costs. In this regard, the search for short AMP derivatives that retain high biological activity is an urgent task.

This work is devoted to the structural and functional characteristics of wheat hevein-like AMPs belonging to the WAMP family, which are effective inhibitors of secreted metalloproteinases of phytopathogens. The aim of the work was to elucidate the role of different regions of the WAMP molecule in antimicrobial activity. To identify the determinants of antimicrobial activity in the WAMP molecule, the peptides corresponding to the central region of the molecule (G1: LCCGKYGFCGSG, G2: CCGKYGFCGSGDAYC), as well as to the sequences of the N- and C-terminal regions (N1: AQRCDGQARGAKC and C1: GKGSCQSQCRCR) were obtained by chemical synthesis.

The isoelectric point of all peptides except G2 exceeds 7. All peptides except G2 are positively charged. The aliphatic index varies from 6.67 to 32.5, and only for C1 it is equal to 0. The Bowman index is close to 0 for G1 and G2 peptides. Only C1 has an instability index greater than 40. All peptides except N1 were predicted to have antimicrobial and anticancer activity. Molecular modeling showed that the N1 and C1 terminal peptides have a similar spatial structure, in which half of the amino acid residues are involved in the formation of α -helix, and in both peptides it is located in the C-terminal region of the molecule. The G1 peptide contains 2 antiparallel strands of the β -structure. The G2 adopts a random coil conformation, however, it is likely to form a single disulfide bond between Cys2 and Cys15. The distribution of polar and non-polar residues in all peptides is uneven, which is typical for AMPs.

Testing of antifungal activity *in vitro* by spore germination assay in a thin agar layer against 7 phytopathogenic fungi: *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Bipolaris sorokiniana*, *Cladosporium cucumerinum*, *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum* and *F. avenaceum*, showed that the C1 peptide effectively inhibits spore germination of *C. cucumerinum* and both *Alternaria* species. The G1 peptide inhibited the germination of *B. sorokiniana* spores and weakly those of *F. culmorum*. Against other fungi, the G1 peptide was inactive. The N1 peptide inhibited the germination of *F. culmorum* spores. Thus, it was found that the terminal regions of the WAMP molecule exhibit greater inhibitory activity against the pathogens studied than the central region. At the same time, the activity of some peptides was higher for particular pathogens as compared to the intact WAMP. The results obtained suggest that the 13-residue

peptides corresponding to the N-and C-terminal regions of the WAMP molecule can be used to develop biopesticides to combat dangerous plant diseases.

The work was supported by the RFBR grant No. 19-016-00069.

УДК 577.15 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-83-84

ВКЛЮЧЕНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА В БЕЛКОВЫЕ ЧАСТИЦЫ КАТАЛАЗЫ

Тагирова М.А., Балабушевич Н.Г., Власова К.Ю., Володькин Д., Головин Ю.И., Клячко Н.Л.

Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, кафедра химической энзимологии, Москва, Россия

Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, Тамбов, Россия

Москва, 119234, Ленинские Горы д. 1, стр. 11Б

e-mail: mashxurat@mail.ru

За последние десятилетия был достигнут большой прогресс в области исследования наночастиц, в частности, являющихся основой для создания различных иммобилизованных систем [1]. Например, пористые микросферы ватерита широко применяются в качестве контейнеров для включения биологически активных веществ.

В данной работе в микрочастицы ватерита с иммобилизованным ферментом каталазой, полученные ранее методом совместного со-осаждения, смешивали с магнитными наночастицами (МНЧ) магнетита, получили микросферы (Micro(NP)Catalase).

Для загрузки МНЧ в микросферы ватерита использовали наночастицы оксида железа, полученные термическим разложением ацетилацетоната железа (III) в бензиловом спирте, модифицированные дофамином. Гидродинамический диаметр МНЧ составлял от 5 до 9-10 нм в зависимости условий проведения синтеза.

Далее изучали влияние низкочастотного переменного магнитного поля (НЧ ПМП) на ферментативную активность каталазы в Micro(NP)Catalase, производя кинетические измерения.

Активность каталазы в микросферах с МНЧ определяли согласно работе [2]. Анализируемый раствор каталазы разбавляли до концентрации 0,005 - 0,010 мг/мл. Реакционную смесь объемом 1 мл готовили смешиванием 820-870 мкл 0,1 М фосфатного буфера (pH=7,0), 30 – 80 мкл разбавленного раствора каталазы, 100 мкл 0,196 М H₂O₂. После этого полученный раствор инкубировали в ПМП в течение 10 мин, и затем измеряли активность фермента спектрофотометрически при 240 нм в течение 30 сек.

Под действием переменного магнитного поля наблюдалось увеличение каталитической активности иммобилизованного фермента. Эффект увеличения активности под действием ПМП наблюдался при частоте поля 50 Гц и интенсивности 110 мТл. Такой эффект можно объяснить механохимическим воздействием на молекулу фермента, вызываемым ориентацией магнитного момента наночастицы по полю.

После включения МНЧ микросферы с каталазой практически не изменились в размерах (3,5-5,8 мкм), а после растворения CaCO₃-ядра добавлением ЭДТА наблюдалось незначительное уменьшение в размере микросфер (3,2-5,0 мкм).

Таким образом, показано одновременное совместное включение каталазы и МНЧ в микросферы ватерита, изучено изменение ферментативной активности каталазы под действием ПМП.

Работа была частично поддержана грантами РФФИ 17-54-33027 и 18-29-09154, темой с гос регистрацией АААА-А16-116052010081-5 и Программой развития МГУ.

Литература

1. Ma X., Yang H., Chen H., Yang L., Guo Y., Si Y. Protein-directed self-assembly of CaCO₃ nanoparticles into hierarchical superstructures // *Journal of Crystal Growth*. – 2011. Vol. 327. №.1. P.146–153.
2. Tracy S.L., Williams D.A., Jennings H.M. The growth of calcite spherulites from solution II. Kinetics of formation // *Journal of Crystal Growth*. 1998. Vol.193. P.382–388.

UDK 577.15 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-83-84

INCLUSION OF MAGNETIC NANOPARTICLES OF MAGNETITE INTO PROTEIN PARTICLES OF CATALASE

Tagirova M.A., Balabushevich N.G., Vlasova K.Yu., Volodkin D., Golovin Yu.I., Klyachko N.L.

*Department of Chemical Enzymology, School of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
G.R. Derzhavin Tambov State University, Tambov, Russia
119234 Moscow, Leninskiye Gory 1-11b
e-mail: mashxurat@mail.ru*

Recently, the great progress has been observed in the field of micro- and nanoparticles that are the platform for the creation of various active molecules delivery systems [1]. For example, porous vaterite microspheres are widely used as containers for delivery of biologically active enzymes.

In this work, vaterite microparticles with an immobilized catalase (enzyme) and magnetic nanoparticles (MNPs) of magnetite, obtained by the co-precipitation method, were used to study the enzyme activity under low frequency alternating magnetic field.

To load MNPs into vaterite microspheres, we used iron oxide nanoparticles obtained by thermal decomposition of iron (III) acetylacetonate in benzyl alcohol, stabilized with dopamine. The mean diameter of magnetic nanoparticles was 9-10 nm. After the inclusion of MNPs, the size of microspheres with catalase did not change (3.5-5.8 μm), and after the dissolution of the CaCO_3 core by adding EDTA, a slight decrease in the size of the microspheres (3.2-5.0 μm) was observed.

Next, the effect of a low frequency alternating magnetic field (LF AMF) on the enzymatic activity of catalase in Micro(NP)Catalase was studied.

Catalase activity in microspheres with magnetic nanoparticles was determined according to [2]. The analyzed catalase solution was diluted to a concentration of 0.005 - 0.010 mg / ml. The reaction mixture with a volume of 1 ml was prepared by mixing 820-870 μl of 0.1 M phosphate buffer (pH = 7.0), 30 - 80 μl of a diluted catalase solution, 100 μl of 0.196 M H_2O_2 . After that, the resulting solution was exposed to LF AMF for 10 min, and then the enzyme activity was measured spectrophotometrically at 240 nm.

An increase in the catalytic activity of the immobilized enzyme under the LF AMF was observed. The maximal effect was observed at a field frequency of 50 Hz and an intensity of 110 mT. This effect can be explained by the mechanochemical action on the enzyme molecule caused by the orientation of the magnetic moment of the nanoparticle along the field.

Thus, the simultaneous joint incorporation of catalase and MNPs into vaterite microspheres has been shown, and the change in the enzymatic activity of catalase under the AC AMF has been studied.

This work was supported in part by RFBR grants 17-54-33027 and 18-29-09154, State Topic AAA-A-16-116052010081-5, MSU Program of Development.

Literature

1. Ma X., Yang H., Chen H., Yang L., Guo Y., Si Y. Protein-directed self-assembly of CaCO_3 nanoparticles into hierarchical superstructures // *Journal of Crystal Growth*. – 2011. Vol. 327. №.1. P.146–153.
2. Tracy S.L., Williams D.A., Jennings H.M. The growth of calcite spherulites from solution II. Kinetics of formation // *Journal of Crystal Growth*. 1998. Vol.193. P.382–388.

УДК 577.15 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-84-86

ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОЧАСТИЦ ВАТЕРИТА С ИММОБИЛИЗИРОВАННЫМ ФЕРМЕНТОМ – КАТАЛАЗОЙ, МЕТОДОМ СОВМЕСТНОГО СООСАЖДЕНИЯ

Тагирова М.А., Балабушевич Н.Г., Володькин Д., Еремеев Н.Л., Клячко Н.Л.

*Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, кафедра химической энзимологии, Москва, Россия
119234, Москва, ул. Ленинские Горы д. 1, стр. 11Б, e-mail: mashxurat5@gmail.com*

Среди полиморфных модификаций CaCO_3 большое внимание привлекает ватерит, который обладает уникальными свойствами, такими как высокая удельная площадь поверхности и контролируемый размер частиц [1]. Ватерит является одним из самых популярных носителей для изготовления микрочастиц в биотехнологии и медицине [2].

В микросферах ватерита включение молекул может осуществляться путем соосаждения (совместный синтез) во время роста кристаллов [3-4]), либо посредством последующей загрузки в предварительно сформированные кристаллы ватерита (например, посредством адсорбции в кристаллические поры [4] или недавно внедренный метод сублимационной сушки [5]).

Наиболее распространенным и высокоэффективным методом включения веществ в микросферы ватерита является соосаждение [4]. Соосаждение позволяет загружать биологически активные вещества различной природы на стадии получения микросфер ватерита. При этом смешивание растворов лекарственного средства с солями-предшественниками приводит к более эффективному улавливанию и однородному распределению лекарства внутри кристаллов при их росте.

В данной работе пористые микрочастицы ватерита с иммобилизованным ферментом каталазой получали смешиванием водных растворов солей CaCl_2 , Na_2CO_3 и фермента с концентрацией 4 мг/мл. Наиболее эффективное включение каталазы было осуществлено методом соосаждения в микросферы ватерита с использованием сшивающего агента - глутарового альдегида. Подобраны оптимальные условия сшивания аминокрупп каталазы глутаровым альдегидом в порах ватерита. Охарактеризованы пористые микрочастицы ватерита с иммобилизованным ферментом каталазой.

Работа была частично поддержана темой с гос регистрацией АААА-А16-116052010081-5 и Программой развития МГУ.

Литература

1. Feoktistova N., Rose J., Prokopovic V.Z., Vikulina A.S., Skirtach A.G., Volodkin D. Controlling the Vaterite CaCO_3 Crystal Pores. Design of Tailor-Made Polymer Based Microcapsules by Hard Templating // *Langmuir*.2016.
2. Schmidt S., Behra M., Uhlig K., Madaboosi N., Hartmann L., Duschl C. Mesoporous protein particles through colloidal CaCO_3 templates // *Advanced Functional Materials*. 2013. Vol.23.№ 1. P.116–123.
3. Sergeeva A., Sergeev R., Lengert E., Zakharevich A., Parakhonskiy B., Gorin D., Sergeev S. and Volodkin D. ACS Appl. Mater. Interfaces. 2015.Vol.7. P.21315–21325.
4. Balabushevich N.G., Lopez de Guereñu A.V., Feoktistova N.A., Skirtach A.G. and Volodkin D. *Macromol. Biosci.*2016.Vol.16. P.95–105.
5. German S.V., Novoselova M.V., Bratashov D.N., Demina P.A., Atkin V.S., Voronin D.V., Khlebtsov B.N., Parakhonskiy B.V, Sukhorukov G.B. and Gorin D.A. *Sci. Rep.* 2018. Vol.8. P.17763.

UDK 577.15 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-84-86

OBTAINING OF VATERITE MICROPARTICLES WITH AN IMMOBILIZED ENZYME – CATALASE BY CO- SYNTHESIS

Tagirova M.A., Balabushevich N.G., Volodkin D., Ereemeev N.L., Klyachko N.L.

Department of Chemical Enzymology, School of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia 119234 Moscow, Leninskiye Gory 1-11b, e-mail: mashxurat5@gmail.com

Among the polymorphic modifications of CaCO_3 , vaterite attracts much attention due to its unique properties such as a high specific surface area, controlled particle size [1], and it is also one of the most popular carriers for the manufacture of microparticles in biotechnology and medicine [2].

The inclusion of molecules into vaterite microspheres can be carried out by co-precipitation (co-synthesis) during crystal growth [3-4] or by subsequent loading into preformed vaterite crystals (for example, by adsorption into crystalline pores [4] or the recently introduced freeze-drying method [5]).

Co-synthesis is the most widespread and highly efficient method of incorporation of substances into vaterite microspheres [4]. Co-synthesis allows loading biologically active substances of different nature at the stage of obtaining vaterite microspheres. At the same time, mixing of drug solutions with precursor salts leads to more efficient trapping and uniform distribution of the drug inside the crystals during their growth.

Thus, porous vaterite microparticles with an immobilized catalase (enzyme) were prepared by mixing aqueous solutions of CaCl_2 , Na_2CO_3 salts and the enzyme. The most efficient incorporation of catalase was carried out by the method of co-synthesis microspheres of vaterite using a cross-linking agent – glutaraldehyde. The optimal conditions for the crosslinking of the amino groups of catalase with glutaraldehyde in the pores of vaterite were selected. Porous microparticles of vaterite with an immobilized catalase enzyme have been characterized.

The work was supported in part by the State Topic АААА-А16-116052010081-5 and MSU Program of Development.

References

1. Feoktistova N., Rose J., Prokopovic V.Z., Vikulina A.S., Skirtach A.G., Volodkin D. Controlling the Vaterite CaCO_3 Crystal Pores. Design of Tailor-Made Polymer Based Microcapsules by Hard Templating // *Langmuir*.2016.

2. Schmidt S., Behra M., Uhlig K., Madaboosi N., Hartmann L., Duschl C. Mesoporous protein particles through colloidal CaCO₃ templates // *Advanced Functional Materials*. 2013. Vol.23.№ 1. P.116–123.
3. Sergeeva A., Sergeev R., Lengert E., Zakharevich A., Parakhonskiy B., Gorin D., Sergeev S. and Volodkin D. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2015. Vol.7. P.21315–21325.
4. Balabushevich N.G., Lopez de Guereñu A.V., Feoktistova N.A., Skirtach A.G. and Volodkin D. *Macromol. Biosci.* 2016. Vol.16. P.95–105.
5. German S.V., Novoselova M.V., Bratashov D.N., Demina P.A., Atkin V.S., Voronin D.V., Khlebtsov B.N., Parakhonskiy B.V., Sukhorukov G.B. and Gorin D.A. *Sci. Rep.* 2018. Vol.8. P.17763.

УДК 544.23 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-86-87

БИОКОРОЗЗИЯ ПОЛИГУАНИДИН-СОДЕРЖАЩИХ КОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭТИЛЕНА

Тихомиров В.А.¹, Герасин В.А.¹, Сивов Н.А.¹, Журина М.В.², Богданов К.И.², Плакунов В.К.², Акар Каунг Мьинг¹

¹ ФГБУН Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, Москва, Россия, ГСП-1, 119991, Ленинский проспект, д.29

² Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, Россия, 119071, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2

e-mail: tikhomirov@ips.ac.ru

Изучены особенности формирования биопленок на поверхности композитного материала на основе полиэтилена. Показано, что биоцидные соединения гуанидинового ряда способны избирательно подавлять рост биопленок некоторых микроорганизмов, не влияя на начальные этапы их адгезии.

Ключевые слова: биоцидная защита, полиэтилен, композитные материалы, монтмориллонит

На сегодняшний день соли полигексаметиленгуанидина (ПГМГ) производятся путем поликонденсации. Благодаря уникальному сочетанию биоцидных, физико-химических и токсикологических характеристик, производные ПГМГ находят применение в качестве биоцидного компонента полимерных композиционных материалов [1]. Метод радикальной полимеризации, разработанный в Институте нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, позволяет синтезировать полимеры и сополимеры гуанидинового ряда различного состава и структуры с молекулярной массой ≥ 1000 кДа [2], замедляющие рост планктонных культур и микробных биопленок, снижающие адаптацию микробов и позволяющие значительно увеличить продолжительность биоцидного действия. Данные полимеры и сополимеры хорошо сорбируются на минеральных носителях и диспергируются в промышленных полиолефинах [3]. Представляется важным изучить антибактериальное и антибиотикопленочное действие сополимеров в составе композитного материала на основе полиэтиленов различной плотности (в типовом ПЭВД и ПЭНД).

Пролонгированное действие биоцидной составляющей нанокompозита осуществляется за счёт десорбции полигуанидина с поверхности частиц инертного нерастворимого носителя - монтмориллонита. Данный процесс может привести к необратимым отрицательным изменениям физико-механических свойств материала.

Изучены особенности формирования биопленок на поверхности композитного материала на основе полиэтилена из смеси планктонных чистых культур микроорганизмов, способных к его биокоррозии [4]. Показано, что биоцидные соединения гуанидинового ряда, добавленные к ПЭВД и ПЭНД в составе комплексного наполнителя, способны избирательно подавлять рост биопленок некоторых микроорганизмов, не влияя на начальные этапы их адгезии. Получены предварительные результаты биокоррозии нанокompозитов в природных средах при участии аборигенных мультитиповых микробных биопленок.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ проект № МК-18-29-05048

Литература

1. Герасин В. А., Менделеев Д. И., Куренков В. В., Меняшев М. Р. Гуанидинсодержащие органоминеральные комплексы как биоцидные добавки для полимерных композитов // *Журнал прикладной химии*. — 2018. — Т. 91, № 7. — С. 1139–1147.
2. Sivov N.A. *Biocide guanidine containing polymers: synthesis, structure and properties*. Leiden Boston, Brill Academic Publishers, 2006. 151 pp.

3. Тихомиров В.А. и др. Разработка методик изучения адсорбции ПАВ, полиэлектролитов на слоистых силикатах по содержанию обменных катионов в маточном растворе // V конференция молодых учёных «Реология и физико-химическая механика гетерофазных систем» тезисы докл. конф. (Москва, 19-20 июня 2017 г.). – Москва, 2017. – С.194-197.
4. Журина М.В. и др. Специфика формирования мультивидовых микробных биопленок на поверхности полиэтилена // Микробиология. – 2020. – №4. – С. 400-409.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-86-87

BIOCORROSION OF POLYETHYLENE-BASED POLYGUANIDINE-CONTAINING COMPOSITE MATERIALS

Tikhomirov V.A.¹, Gerasin V.A.¹, Sivov N.A.¹, Zhurina M.V.², Bogdanov K.I.², Plakunov V.C.², Ahkar Kaung Myint¹

¹ Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, 119991, 29, Leninskiy Prospekt.

² Winogradsky Institute of Microbiology, Federal research centre "Fundamentals of biotechnology" of the RAS, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, 119071, 7 b.2, Prospekt 60 let Oktyabrya.
e-mail: tikhomirov@ips.ac.ru

Characteristics of biofilm formation on the surface of polyethylene composite material were studied. It was shown that guanidine-based biocidal compounds are capable of selectively inhibiting the growth of biofilms for some microorganisms, without affecting the initial stages of adhesion.

Key words: biocide protection, polyethylene, composite materials, montmorillonite.

To date, polyhexamethylene guanidine (PHMG) salts are commercially produced by polycondensation. Due to the unique combination of biocidal, physicochemical, and toxicological characteristics, PHMG derivatives are applied in different areas, in particular, as a biocidal component of polymer composite materials [1]. Free-radical polymerization method, developed in Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis RAS, allows to synthesize guanidine polymers and copolymers with different composition and structure, and molecular weight ≥ 1000 kDa [2], which delay planktonic cultures and microbial biofilms growth, reduce the microbial adaptation and significantly increase the duration of biocidal action. These polymers and copolymers are sorbed on mineral supports and disperse well in commercial polyolefins [3]. It seems essential to research copolymers antibacterial and antibiofilm action in composite materials, based on different density polyethylenes (in typical LDPE and HDPE).

Prolonged action of nanocomposite biocide component is carried out by the way of polyguanidine desorption from the montmorillonite particle surface, which is the inert insoluble supporter. This process may lead to the irreversible degeneration of material physical and mechanical properties.

Particularities of biofilm formation on the surface of PE-based composite materials, from a mixture of pure planktonic cultures of biocorrosion-capable microorganisms were studied [4]. It is shown that the guanidine derivatives biocide compounds, added to both LDPE and HDPE as part of the complex filler, are capable of selectively inhibiting some microorganisms biofilms growth without affecting their adhesion initial stages. Preliminary results of nanocomposite biocorrosion in natural environment involving native multi-species microbial biofilms have been obtained.

The work is carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research project № МК-18-29-05048.

References

1. Gerasin VA., Mendeleev DI, Kurenkov VV, et al. Guanidine-Containing Organomineral Complexes as Biocide Additives to Polymeric Composites // *Russian Journal of Applied Chemistry*. – 2018. vol.91. pp. 1297–1304.
2. Sivov N.A. Biocide guanidine containing polymers: synthesis, structure and properties. CRC Press, 2006. 156 pp.
3. Tikhomirov V.A. et al. Technique development for study of SAS, polyelectrolytes adsorption on phyllosilicates, by the exchangeable cations content at the dispersion liquid. // V young scientists conference «Rheology and physical-chemical mechanic of heterophase systems» theses of conf. (Moscow, 19-20 of June, 2017 year). – Moscow, 2017. – pp.194-197.
4. Zhurina M.V., Kallistova A.Yu., Panyushkina A.E. et al. Specific Features of Formation of Multispecies Microbial Biofilms on Polyethylene Surface // *Microbiology*. – 2020. – vol. 89, No. 4. – pp. 396–404.

УДК: 606 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-88-89

ЭЛЕКТРОСПИННИНГ КОЛЛАГЕНОВЫХ МАТРИКСОВ: СТРУКТУРНАЯ СТАБИЛИЗАЦИЯ И МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Е.М.Трифанова, А.О.Мариянац, В.К.Попов

Институт фотонных технологий ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН, РФ, 108840, г. Москва, г. Троицк, Пионерская, 2, e-mail: katikin@mail.ru, 89859790837

Исследованы механические свойства высокопористых коллагеновых матриц, изготовленных методом электроспиннинга и стабилизированных диглицидиловым эфиром 1,4-бутандиола (ДГЭБ), в зависимости от концентрации ДГЭБ в исходной композиции, типа растворителя и концентрации ДГЭБ в растворе для структурной стабилизации, а также время выдержки матриц в этом растворе.

Ключевые слова: электроспиннинг, коллаген, механические свойства, диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола

Коллагеновые нетканые матрицы, изготовленные методом электроспиннинга, перспективны для применения в биомедицине. Существует ряд ограничений, связанных с недостаточной механической прочностью матриц во время их использования в биологических экспериментах. Для стабилизации подобных структур применяются различные химические сшивающие агенты, одним из которых является диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола (ДГЭБ). Степень сшивания при помощи ДГЭБ зависит от различных условий протекания реакции (концентрации реагентов, температуры, pH, времени выдержки и т.д.). Кроме того, влияние оказывают условия хранения готовых образцов перед биологическими экспериментами.

В настоящей работе исследуется влияние различных условий стабилизации коллагеновых матриц, изготовленных методом электроспиннинга, на их механические свойства. Из исходного раствора (4% коллагена, 96% гексафторизопропанола) методом электроспиннинга (напряжение между электродами 20 кВ, расстояние между ними 12 см) формировали волокнистые матрицы. В экспериментах варьировали: концентрацию ДГЭБ в исходном растворе; тип растворителя, в котором выдерживали готовый матрикс для стабилизации; концентрацию ДГЭБ в этом растворе; время выдержки матриц в растворе. Перед механическими испытаниями образцы дополнительно выдерживали 1 сутки в растворе фосфатно-солевого буфера (ФСБ) без высушивания для моделирования состояния образцов во время экспериментов *in vitro* и *in vivo*. Также были исследованы образцы, высушенные сразу после их стабилизации. Для проведения испытаний на растяжение полученные матрицы, нарезали прямоугольниками размером 5x20 мм², которые затем растягивали на испытательной машине вдоль их продольной оси с постоянной скоростью 10 мм/мин. В процессе растяжения измеряли нагрузку, выдерживаемую образцом, и его удлинение непрерывно вплоть до его разрыва. По полученным данным определяли модуль Юнга. Результаты механических испытаний показывают, что увеличение времени выдержки и концентрации ДГЭБ в стабилизирующем растворе, а также добавление ДГЭБа в исходную композицию повышают механические характеристики матриц. Более того, показано, что предварительная стабилизация исходных матриц в течение 6 суток в растворе изопропанола с 15% ДГЭБ, затем их сушка на воздухе при комнатной температуре в течение 3 суток и последующая иммерсия в раствор ФСБ, делают эти матрицы на порядок более прочными, по сравнению с образцами помещенными в ФСБ без такой сушки.

Таким образом, проведены сравнительные исследования механических свойств коллагеновых матриц, полученных методом электроспиннинга, в зависимости от условий их структурной стабилизации, а также разработана методика существенного увеличения их механической прочности.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН и РФФИ в рамках научного проекта №18-29-01021_мк в части разработки коллагеновых матриц.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-88-89

ELECTROSPINNING OF COLLAGEN MATRIXES: STRUCTURAL STABILIZATION AND MECHANICAL PROPERTIES

E.Trifanova, A.Mariyanats, V.Popov

Institute of Photonic Technologies Federal Research Center "Crystallography and Photonics" RAS, Russian Federation, 108840, Moscow, Troitsk, Pionerskaya, 2

The mechanical properties of highly porous collagen matrices made by electrospinning and stabilized with 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDGE) were studied depending on the concentration of BDDGE in the initial composition, the type of solvent and the concentration of BDDGE in the solution for structural stabilization, and the matrices holding time in this solution

Key words: electrospinning, collagen, mechanical properties, 1, 4 butanediol diglycidyl ether

Electrospun collagen nonwoven matrices are promising for use in biomedicine. There are a number of limitations associated with the insufficient mechanical strength of the matrices during their use in biological experiments. To stabilize such structures, various chemical crosslinking agents are used, one of which is 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDGE). The degree of crosslinking with BDDGE depends on various conditions of the reaction (concentration of reagents, temperature, pH, holding time, etc.). In addition, the storage conditions of the ready samples before biological experiments have an effect.

In this paper, we study the effect of various stabilization conditions for electrospun collagen matrices on their mechanical properties. Fiber matrices were formed from the initial solution (4% collagen, 96% hexafluoroisopropanol) by electrospinning (voltage difference between electrodes 20 kV, distance between them 12 cm). In the experiments, we varied: the concentration of BDDGE in the initial solution; type of solvent in which the ready matrix was kept for stabilization; the concentration of BDDGE in this solution; matrices immersion time in the solution. Before mechanical testing, the samples were additionally kept for 1 day in a solution of phosphate-buffered saline (PBS) without drying to simulate the state of the samples during *in vitro* and *in vivo* experiments. Samples dried immediately after their stabilization were also investigated. To conduct tensile tests, the ready matrices were cut into 5x20 mm² rectangles, which were then stretched on a testing machine along their longitudinal axis at a constant speed of 10 mm/min. During the stretching process, the load held by the specimen and its elongation was measured continuously up to its rupture. From the data obtained, Young's modulus was determined. The results of mechanical tests show that an increase in the exposure time and concentration of BDDGE in the stabilizing solution, as well as the addition of BDDGE to the initial composition, increase the mechanical characteristics of the matrices. Moreover, it was shown that preliminary stabilization of the initial matrices for 6 days in a solution of isopropanol with 15% BDDGE, then their drying in air at room temperature for 3 days and subsequent immersion in a solution of PBS, make these matrices an order of magnitude stronger compared with samples placed in the PBS without such drying.

Thus, comparative studies of the mechanical properties of collagen matrices obtained by the electrospinning method, depending on the conditions of their structural stabilization, have been carried out, and a technique has been developed to significantly increase their mechanical strength.

Grant: This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education in the framework of the work on the state assignment of the Federal Research Center "Crystallography and Photonics" RAS and RFBR in the framework of the scientific project No. 18-29-01021_mk regarding the development of collagen matrices.

УДК 577.15 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-90-91

УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК *E. COLI* С ПОМОЩЬЮ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ПРИСУТСТВИИ НИЗКОЧАСТОТНОГО ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ

А.Д. Усвалиев¹, А. Моськин, Н.Д. Дагаев¹, С.Л. Грибановский³, А.О. Жигачев³, Д.Ю. Головин³, С.А. Легоцкий¹, М.М. Веселов¹, К.Ю. Власова¹, А.В. Лапанькова¹, К.А. Мирошников⁴, Н.Г. Белогурова¹, Е.А. Зайцева¹, А.В. Кабанов^{1,5}, А.Г. Мажуга^{6,2,1}, Ю.И. Головин^{1,3}, Н.Л. Клячко^{1,3,5}

¹ Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Ленинские горы, 1-11Б, Россия

² Национальный технологический университет «МИСиС», Москва, Россия

³ Наносенс, Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, Тамбов, Россия

⁴ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

⁵ University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA

⁶ Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия 119234 Москва, Ленинские Горы д. 1, стр. 3, e-mail: azximik@gmail.com

Ключевые слова: магнитные наночастицы, низкочастотное магнитное поле, эндолизин

В настоящее время большое число инфекционных заболеваний имеют бактериальную этиологию и являются проблемой здравоохранения мирового масштаба. Большинство из них вызываются грамотрицательными патогенными микроорганизмами. Традиционным способом лечения инфекционных заболеваний является терапия с применением антибиотиков, однако быстрое развитие устойчивости патогенных микроорганизмов к существующим препаратам заставляет искать новые способы борьбы против них.

В качестве одной из таких альтернатив является терапия эндолизинами бактериофагов - бактериолитическими ферментами, способными разрушать стенку бактериальной клетки путем гидролиза пептидогликана. Эндолизины очень специфичны по отношению к определенным патогенам. Основным ограничением их применения по отношению к грамотрицательным бактериям является наличие у последних внешней мембраны, препятствующей проникновению литического фермента к его субстрату. Эффективность проникновения эндолизина можно повысить за счет дестабилизации внешней мембраны грамотрицательных бактерий с помощью механического воздействия посредством магнитных наночастиц под воздействием низкочастотного негреющего поля.

В этом исследовании использовались эндолизин Lys394 и стержневидные (40 x 10 нм) функционализированные дофамином магнитные наночастицы (МНЧ). Было показано, что применение ультранизкочастотного (50 Гц) переменного магнитного поля (ПМП) в присутствии МНЧ приводит к дестабилизации внешней мембраны клеток *E.coli*. МНЧ, модифицированные дофамином, притягиваются к внешней мембране клеток за счёт электростатического взаимодействия аминогрупп дофамина с фосфолипидами. При применении ПМП в сочетании с МНЧ в мембране возникают сложные осциллирующие движения, приводящие к деформации мембраны с нормальной и латеральной составляющими. Такие деформации приводят к увеличению проницаемости мембраны, что облегчает проникновение фермента к своему субстрату (пептидогликану), что увеличивает скорость лизиса клеток *E.coli*.

Было показано, что при действии ПМП в присутствии МНЧ происходит высвобождение β-лактамазы из периплазмы клеток *E.coli*. Также с помощью гидрофобного красителя Nile Red было показано, что действие ПМП приводит к его высвобождению из встроенных участков в мембране клеток.

В ходе работы по оптимизации методики синтеза МНЧ было выявлено, что одновременное уменьшение времени синтеза частиц и увеличение концентрации дофамина позволяет получить более стабильные частицы с узким распределением по размерам.

Работа была частично поддержана грантами РФФИ 17-54-33027 and 18-29-09154, темой с гос регистрацией АААА-А16-116052010081-5 и Программой развития МГУ.

УДК 577.15 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-90-91

INCREASING PERMEABILITY OF OUTER MEMBRANE OF *E. COLI* UNDER ULTRA-LOW FREQUENCY ALTERNATING MAGNETIC FIELD IN THE PRESENCE OF MAGNETIC NANOPARTICLES

**A.D. Usvaliev¹, A.V. Nikitin², N.D. Dagaev¹, S.L. Gribovsky³, A.O. Ghigachev³, D.Y. Golovin³, S.A. Legotsky¹,
M.M. Veselov¹, K.Yu. Vlasova¹, A.V. Lapankova¹, K.A. Miroshnikov⁴, N.G. Belogurova¹, E.A. Zaitseva¹,
A.V. Kabanov¹, A.G. Majouga^{6,2,1}, Yu. I. Golovin^{1,3}, N.L. Klyachko^{1,3,5}**

¹ M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Leninskie Gory, 1-11B, Russia

² National University of Science and Technology "MISIS" (MISIS), Moscow, Russia

³ G.R. Derzhavin Tambov State University, Tambov, Russia

⁴ M.M. Shemyakin, Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

⁵ University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA

⁶ D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

e-mail: azximik@gmail.com

Key words: magnetic nanoparticles, low-frequency magnetic field, endolysin

Currently, the bacterial etiology infectious diseases still remain a global health problem. Most of them are caused by gram-negative pathogenic microorganisms. The traditional method of infectious diseases treatment is based on the use of antibiotics. However, the rapid development of the resistance of pathogenic microorganisms to existing antibiotics forces to seek alternatives to traditional therapy. One of such alternatives is the therapy with bacteriophage endolysins - bacteriolytic enzymes capable of destroying the bacterial cell wall by hydrolyzing the peptidoglycan. Endolysins are highly specific for certain pathogens. The main limitation of their use towards gram-negative bacteria is the presence of an outer membrane in the latter preventing the penetration of lytic enzyme to its substrate. The effectiveness of endolysin penetration can be increased by destabilizing the outer membrane of gram-negative bacteria.

In this study, endolysin Lys394 and rod-like (40 x 10 nm) dopamine functionalized magnetic nanoparticles (MNPs) were used. It was shown that application of ultra-low frequency (50 Hz) alternating magnetic field (AMF) in the presence of MNPs leads to the destabilization of the outer membrane of *E. coli* cells. Electrostatic interactions take place between positively charged amino groups of dopamine and negatively charged phosphate groups of membrane phospholipids. Complex oscillating motions and membrane deformations with normal and lateral components occur under AMF application. Such deformations lead to the increase of the enzyme penetration to its substrate (peptidoglycan) enhancing the rate of *E. coli* cells lysis.

AMF membrane destabilizing effect was confirmed by β -lactamase release from *E. coli* cell periplasm as well as significant decrease of the hydrophobic dye Nile Red fluorescence intensity.

In the course of work on the optimization of the method for the synthesis of magnetic nanoparticles, it was revealed that a simultaneous decrease in the time of the particle synthesis and an increase in the concentration of dopamine makes it possible to obtain more stable particles with narrow distribution in size.

The work was supported by RFBR grants 17-54-33027 and 18-29-09154, State Topic AAAA-A16-116052010081-5, MSU Program of Development.

УДК 577.17 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-92-94

СИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИСТИКА БИФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ПЛАТФОРМЫ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ МАГNETИТ-ЗОЛОТО ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Чудосай Ю. В., к.х.н., Ефремова М.В., к.х.н., Захарко М.А., д.х.н., проф. Клячко Н. Л., к.х.н., зав.лаб. Абакумов М. А.

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
119991, Москва, Ленинские горы, 1-11Б

² Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва, Россия
119049, Москва, Ленинский пр., д. 4
e-mail: chudosay@gmail.com

В работе получены гибридные наночастицы магнетит-золото, обладающие высокими контрастными характеристиками в магнитно-резонансной томографии, а также возможностями для использования в фотодинамической терапии.

Ключевые слова: наночастицы, магнетит-золото, магнитно-резонансная томография, онкологические заболевания, диагностика, фотодинамическая терапия, тераностика

Одним из наиболее интересных объектов с точки зрения применения в биомедицине являются гибридные структуры на основе магнитных наночастиц (НЧ) и НЧ благородных металлов (в том числе, золота), которые дают возможность одновременного введения двух типов лигандов на поверхность НЧ для нескольких вариантов их дальнейшего использования: адресной доставки (комбинации магнитной гипертермии и магнитно-резонансной томографии с фототермальной терапией) или для фотодинамической терапии рака (ФДТ) (комбинация фотосенсибилизатора (ФС) для терапии и флуорофора (ФФ) для детекции платформы). Синтез обеих бифункциональных платформ является перспективным направлением и вызывает интерес у ученых.

В связи с вышесказанным, целью данной работы являлись синтез и исследование НЧ Fe₃O₄-Au со структурой «гантель» как бифункциональной платформы для доставки лекарств и для ФДТ онкологических заболеваний.

В результате разложения пентакарбонила железа в дифениловом эфире в присутствии тетрахлоуроаурата водорода были синтезированы гибридные НЧ магнетит-золото размером Fe₃O₄ 10,8±1,5 нм и Au 4,4±0,8 нм (по данным просвечивающей электронной микроскопии), стабилизированные олеиновой кислотой. Согласно результатам рентгенофазового анализа, синтезированные НЧ имеют кристаллическую структуру типа «шпинель» с периодом решетки 0,8387 нм (промежуточное значение между магнетитом и маггемитом). По результатам измерения магнитных свойств НЧ обладали намагниченностью насыщения 62 Ам²-кг (Fe₃O₄)⁻¹ и коэрцитивной силой 13 Э. НЧ были модифицированы биосовместимым амфифильным полимером (Pluronic F-127) для эффективного перевода в водную фазу за счет гидрофильной части, а также создания гидрофобных «карманов» для последующей загрузки лекарства и ФС.

Для первой платформы использовался коммерческий противоопухолевый препарат доксорубицин (DOX), нагрузка которого составила 12,68%. Кроме того, было синтезировано низкомолекулярное серосодержащее производное PSMA вектора для дальнейшей шивки с НЧ золота в составе гибридных структур. В дальнейшем НЧ магнетит-золото, несущие на поверхности как противоопухолевый препарат, так и векторные молекулы (Fe₃O₄-Au/DOX/PSMA), будут исследованы *in vitro* на клетках аденокарциномы предстательной железы человека с точки зрения возможности адресной доставки лекарства за счет специфичности к PSMA-вектору, а также для визуализации опухолевых клеток методом магнитно-резонансной томографии.

Для синтеза второй платформы была исследована серия ФС на основе хлорина и ФФ на основе нафталимида для использования в качестве компонентов бифункциональной платформы для ФДТ. Поскольку два различных окрашенных вещества (ФС и ФФ) необходимо совместить в одной системе, в качестве «связующего звена» были использованы синтезированные НЧ Fe₃O₄-Au со структурой «гантель». Синтезированное дисульфидное производное 4-стирилнафталимида (соединение 3) было охарактеризовано с помощью ЯМР спектроскопии, которая подтвердила наличие ФФ. Оценены и исследованы спектральные характеристики ФФ (поглощение и флуоресценция, хлороформ, C=2.2·10⁻⁶ моль/л). Рассчитан квантовый выход флюо-

ресценции синтезированного ФФ (3), который составил 5%, это значение было использовано при расчетах эффективности переноса энергии. Расчет эффективности переноса энергии был сделан для выбора самого эффективного из серии ФС (OVF670, OVF671, OVF673, OVF674). Минимальный перенос энергии, говорящий о максимально используемой энергии для образования активной формы кислорода (АФК), был зафиксирован у OVF674 ($2.23 \cdot 10^{13}$), при этом критический радиус Ферстера составил 15 Å. Квантовый выход генерации синглетного кислорода составил 0.62 для OVF674 (максимальное значение среди всех ФС). Из проведенного исследования был сделан вывод, что оптимальной для модификации наночастиц является FRET-пара ФФ и ФС (OVF674). Далее был проведен синтез второй бифункциональной платформы - $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au/ФФ/ФС}$ и исследованы гидродинамический размер (304 нм) и ζ -потенциал (-40 мВ). В дальнейшем планируется завершить характеристику $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au/ФФ/ФС}$ и провести испытания *in vitro* на клетках.

Работа частично поддержана программой "УМНИК" в рамках НОМК "Восточно-Европейский" 2019, грантами РФФИ 18-33-01232 мол_а, 17-54-33027, 18-29-09154, темой Гос. Регистрации АААА-А16-116052010081-5, Программой развития МГУ, а также программой повышения конкурентоспособности НИТУ «МИСиС» № КЗ-2017-022.

UDK 577.17 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-92-94

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF A BIFUNCTIONAL PLATFORM BASED ON MAGNETITE-GOLD NANOPARTICLES FOR THERANOSTICS OF CANCER

Chudosai I.V., Ph.D., Efremova M.V., Ph.D., Zakharko M.A., Ph.D., Prof. Klyachko N. L., Ph.D., Head of Laboratory Abakumov M.A.

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Department of Chemical Enzymology, Moscow, Russia 119991, Moscow, Leninskiye Gory, 1-11B

² National University of Science and Technology «MISIS», Moscow, Russia 119049, Moscow, 4-B Leninsky prospect
e-mail: chudosay@gmail.com

In this work, hybrid magnetite-gold nanoparticles have been obtained, which have high contrast characteristics in magnetic resonance imaging, as well as opportunities for use in photodynamic therapy

Key words: nanoparticles, magnetite-gold, magnetic resonance imaging, oncological diseases, diagnostics, photodynamic therapy, theranostics

Recently hybrid structures based on magnetic nanoparticles (NPs) and NPs of noble metals (including gold) raised a lot of interest due to, possibility to simultaneously use two types of ligands on the surface of NPs. For example a combination of magnetic hyperthermia and magnetic resonance imaging with photothermal therapy or for photodynamic therapy (PDT) (a combination of a photosensitizer (PS) for fluorophore (FP) therapy for platform detection). Synthesis of bifunctional platforms is an interesting direction and is of interest to scientists.

According to the aim of this work, the synthesis and study of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ NPs with a "dumbbell" structure as a bifunctional platform for drug delivery and PDT of oncological diseases was carried out.

As a result of the decomposition of iron pentacarbonyl in diphenyl ether in the presence of hydrogen tetrachlorourates, hybrid magnetite-gold NPs with Fe_3O_4 size of 10.8 ± 1.5 nm and Au 4.4 ± 0.8 nm (according to transmission electron microscopy) stabilized with oleic acid were synthesized. According to the results of x-ray phase analysis, the synthesized nanoparticles have a "spinel" type crystal structure with a lattice period of 0.8387 nm (an intermediate value between magnetite and maghemite). According to the results of measuring the magnetic properties, the NPs had a saturation magnetization of $62 \text{ Am}^2\text{-kg} (\text{Fe}_3\text{O}_4)^{-1}$ and a coercive force of 13 Oe. Further, the NPs were modified with a biocompatible amphiphilic polymer (Pluronic F127) for efficient transfer to the aqueous phase, as well as to create hydrophobic "pockets" for loading drugs and for loading PS.

In addition, a loading capacity of 12.68% of commercial antitumor drug, doxorubicin (DOX) was obtained. Also low molecular weight sulfur-containing derivative of PSMA was synthesized. In addition, magnetite-gold, DOX loaded and PSMA conjugated ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au} / \text{DOX} / \text{PSMA}$) will be tested *in vitro* on human prostate adenocarcinoma cells in terms of the possibility of drug delivery at the expense of specificity for PSMA -vector, as well as for visualization of tumor cells by magnetic resonance imaging.

To study the second platform, a series of PS based on chlorin and FP were developed for the use as

components of a bifunctional platform for PDT. These two different colored substances (PS and FP) must be compatible in one system, in which synthesizing $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ NPs with a dumbbell structure were used. The synthesized disulfide derivative of 4-styrylnaphthalimide (compound 3) was characterized by NMR spectroscopy, which confirmed the presence of FF. Estimated and studied spectral characteristics of the FP were defined (absorption and fluorescence, chloroform, $C = 2.2 \cdot 10^{-6}$ mol / l). Fluorescence efficiency for FP (3) was equal to 5%. The calculation of the energy transfer efficiency was carried out from the PS series (OVF670, OVF671, OVF673, OVF674). The minimum transferred energy, which was found for OVF674 was equal to 2.23×10^{13} , while the critical Foerster radius was 15 Å. For the final choice, the FRET pairs were determined using the method of catching the quantum yield of singlet oxygen generation, which was 0.62 for OVF674 (the maximum value among all PSs). From the studies, it was concluded that the optimal PS for FRET pair with FP is PS OVF674. Next, a second bifunctional platform was synthesized - $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ / FP / PS and with hydrodynamic size (304 nm) and ζ -potential (-40 mV). In the future, it is planned to complete the characterization of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ / FP / PS and to conduct *in vitro* tests on cells.

This work was supported by the UMNK program within the framework of the Vostochno-Evropeyskiy NOMK, 2019, RFBR grants 18-33-01232, 17-54-33027, 18-29-09154, State Topic AAAA-A16-116052010081-5, MSU Program of Development, and the Increase Competitiveness Program of NUST MISIS K3-2017-022.

УДК 579.2, 615.46 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-94-95

РАНЕВЫЕ ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ: СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ

Шумилова А.А., Шишачкая Е.И.

ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет» г. Красноярск, Россия
660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79
e-mail: shumilova.ann@mail.ru

Получены и комплексно исследованы полимерные раневые покрытия на основе бактериальной целлюлозы, в том числе нагруженные антибактериальными препаратами и наночастицами серебра. Регенеративные свойства разработанных покрытий доказаны в эксперименте на лабораторных животных с модельным дефектами гнойных ран и ожогом III степени.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, способ культивирования, композиты, антибиотики, наночастицы серебра, П(ЗГБ/4ГБ), раневые покрытия.

Среди широкого спектра перевязочных средств и полимерных покрытий бактериальная целлюлоза (БЦ) вызывает больший научный интерес. БЦ имеет высокопористую структуру, способность поглощать воду (содержание воды > 90%) и обладает механическими характеристиками, близкими к мягким тканям (M.Panga et al. 2020). Не смотря на активные исследования, показывающие возможность применения БЦ для лечения инфицированных ран, многие вопросы биотехнологии БЦ не раскрыты.

В качестве материала для получения раневого покрытия в данной работе использованы образцы бактериальной целлюлозы, синтезированные штаммом - продуцентом *Komagataeibacter xylinus* B-12068 (Патент № 2014150288/10). Исследовано влияние способов культивирования (поверхностный, глубинный, с перемешиванием) и состава среды на выход БЦ. Отработана технология получения пленок БЦ различных размеров с заданной структурой микрофибрилл. Для придания БЦ антибактериальных свойств получены пленки БЦ с антибиотиками (амикацин, цефтриаксон) и наночастицами серебра (AgNps). С использованием диско-диффузионного метода и суспензионных культур референтных штаммов *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* 204 и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (основных патогенов инфицированных ран) показано, что все образцы БЦ обладают выраженной антибактериальной активностью, при этом более активны композиты БЦ/антибиотики по сравнению с композитами БЦ/AgNps.

Антибактериальные свойства разработанных раневых покрытий БЦ, нагруженных цефтриаксоном доказаны *in vivo* на модели гнойных ран лабораторных животных, инфицированных *St. aureus* 209P.

В качестве биотехнологических дермальных эквивалентов разработана серия гибридных систем на основе БЦ и сополимера поли-3-гидроксibuтирата-4-гидроксibuтирата [БЦ/П(ЗГБ/4ГБ)], нагруженных стимуляторами ранозаживления (актовегин, фибробласты, дифференцированными из ММСК), исследованы на модели ожоговых ран III степени лабораторных крыс Вистар в сравнении с повязкой ВоскоПран (контроль). Исследование динамики ранозаживления с привлечением планиметрии ран, гистологической техники, биохимиче-

ских и молекулярных методов детекции факторов ангиогенеза, воспаления, коллагена 1-го типа, кератина 10 и 14 показало более активное течение процесса заживления ран под всеми экспериментальными раневыми покрытиями по сравнению с коммерческим препаратом. На основе полученных результатов разработаны и зарегистрированы в органах Росстандарта Технические условия «ТУ 9390-010-02067876-2017 Биотехнологические раневые покрытия»; получен сертификат соответствия РОСС RU.АЯ08.Р008062 № 0002995; разработаны рекомендации для клинических исследований.

Патент РФ № 2014150288/10, 2014.12.

Литература

M.Panga, Y.Huang et al. *Application of bacterial cellulose in skin and bone tissue engineering// European Polymer Journal* 2020.Vol. 122, P. 109365

UDC 579.2, 615.46 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-94-95

WOUND DRESSINGS BASED ON BACTERIAL CELLULOSE: PREPARATION, PROPERTIES AND USE

Shumilova A.A., Shishatskaya E.I.

Siberian Federal University, 79 Svobodnyi Av., Krasnoyarsk 660041, Russia
e-mail: shumilova.ann@mail.ru

Polymer wound dressings based on bacterial cellulose, including those loaded with antibacterial drugs and silver nanoparticles, were produced and comprehensively studied. Regenerative properties of the experimental wound dressings were tested using laboratory animals with model defects of suppurating wounds and third-degree skin burns.

Key words: bacterial cellulose, cultivation method, composites, antibiotics, silver nanoparticles, P(3HB/4HB), wound dressings.

Among a wide range of dressings and polymer coatings, bacterial cellulose (BC) has aroused the greatest interest of researchers. BC has highly porous structure, the ability to absorb water (content of water > 90%) and mechanical characteristics similar to those of soft tissue (M.Panga et al. 2020). Although much research effort has been devoted to potential use of BC in the treatment of infected wounds, very many aspects of BC biotechnology remain unclear.

In this study, samples of bacterial cellulose synthesized in the *Komagataei bacterxylinus* B-12068 culture (Patent No. 2014150288/10) were used as wound dressing material. The effects of cultivation method (surface, deep, and with stirring) and composition of the medium on the production of BC were studied. The technology of producing BC films of different sizes and with a definite structure of microfibrils was developed. To impart antibacterial properties to BC, the BC films were loaded with antibiotics (amikacin, ceftriaxone) and silver nanoparticles (AgNps). The disk-diffusion method and the shake-flask culture method used in this study showed that all experimental composites had pronounced antibacterial activity against reference strains of *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas eruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* 204 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and the BC/antibiotic composites were more active than BC/AgNp ones.

Antibacterial properties of the experimental BC wound dressings loaded with ceftriaxone were confirmed *in vivo* on the model of suppurating wounds in laboratory animals infected with *St.aureus* 209P.

Hybrid systems based on BC and a copolymer of poly-3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate loaded with drugs promoting wound healing (actovegin, fibroblasts differentiated from MMSc) were constructed as hybrid wound dressings. They were tested on third-degree skin burns of Wistar rats and compared with VaskoPran dressing (control group).

Wound planimetry, histological examination, and biochemical and molecular methods of detecting factors of angiogenesis, inflammation, type I collagen, and keratin 10 and 14 were used to monitor wound healing. Experimental wound dressings promoted healing more effectively than VoskoPran – a commercial wound dressing.

Technical specifications «TS 9390-010-02067876-2017 Biotechnological wound dressings» based on results obtained were developed and registered in Rosstandart; certificate of conformity ROSS RU.АЯ08.Р008062 No. 0002995 was obtained; recommendations for clinical trials were developed.

RF Patent No. 2014150288/10, 2014.12.

References

M.Panga, Y.Huang et al. *Application of bacterial cellulose in skin and bone tissue engineering// European Polymer Journal* 2020.Vol. 122, P. 109365.

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

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

Руководители

В.Ю. Макеев д.ф.-м.н., член-корреспондент РАН, зав. отделом ФБГНУ ИОГен РАН им. Н.И. Вавилова / V.Y. Makeev, corresponding member of RAS, doctor of science (Physics and Mathematics) head of Division, N.I. Vavilov Institute of General Genetics of RAS

Н.В. Позднякова Директор по исследованиям и развитию АФК "Система" / N.V.Pozdnyakova, head of Research and Development SISTEMA JSFC

А. Кривенко зам.директора по работе с государственными органами и институтами развития Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича /

A. Krivenko, deputy director for relations with government agencies and development institutions of Institute of Biomedical Chemistry

| | |
|---|-----|
| 1. «ИНЬ-ЯН»-ГЕНЫ В ОНКОПАТОЛОГИИ, ШИЗОФРЕНИИ И АУТИСТИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВАХ Т.В.Буткова, К.А.Мальсагова, А.А.Степанов, А.А.Синицына, А.А.Изотов, А.Л.Кайшева. | 97 |
| YIN-YANG GENES IN CANCER, SCHIZOPHRENIA, AND AUTISM SPECTRUM DISORDERS T.V.Butkova, K.A.Malsagova, A.A.Stepanov, A.A.Sinitsyna, A.A.Izotov, A.L.Kaysheva. | 98 |
| 2. РАЗРАБОТКА <i>In vitro</i> МОДЕЛИ GNAO1-ЭНЦЕФАЛОПАТИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНЫХ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ Лунев Е.А., Лучкина Е.А., Савченко И.М., Веляев О.А., Логинов В.А., Поликарпова А.В., Васильева С.Г., Егорова Т.В., Бардина М.В. | 99 |
| <i>In vitro</i> GNAO1-ENCEPHALOPATHY MODEL DEVELOPMENT USING RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUSES Lunev E.A., Luchkina E.A., Savchenko I.M., Velyaev O.A., Loginov V.A., Polikarpova A.V., Vassilieva S. G., Egorova T.V, Bardina M.V. | 100 |
| 3. СОЗДАНИЕ АДЕНО-АССОЦИИРОВАННЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ GNAO1-ЭНЦЕФАЛОПАТИИ Е.А. Лучкина, Е.А. Лунев, А.А. Шмидт, А.Ю. Хаматова, Д.В. Цвиркун, М.В. Бардина | 101 |
| AAV VECTOR DEVELOPMENT FOR GENE THERAPY OF GNAO1 ENCEPHALOPATHY E.A. Luchkina, E.A. Lunev, A.A.Shmidt, A.Y. Khamatova, D.V. Tsvircun, M.V. Bardina | 102 |
| 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ 3,4-ДИМЕТОКСИКОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ НА ПАТОЛОГИЧЕСКУЮ АГРЕГАЦИЮ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА Медведева М.В., Барина К.В., Мельникова А.К., Муронец В.И. | 102 |
| THE EFFECT OF 3,4-DIMETHOXYCINNAMIC ACID DERIVATIVES ON PATHOLOGICAL AGGREGATION OF ALPHA-SYNUCLEIN Medvedeva M.V., Barinova K.V., Melnikova A.K., Muronetz V.I. | 103 |
| 5. ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ САЙТОВ РЕДАКТИРОВАНИЯ РНК ГЕНОВ ЕСТЕСТВЕННО-РАЗВЕРНУТЫХ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ Поздышев Д.В., Медведева М.В., Муронец В.И. | 104 |
| IDENTIFICATION OF THE POTENTIAL RNA EDITING SITES FOR GENES OF INTRINSICALLY DISORDERED PROTEINS ASSOCIATED WITH NEURODEGENERATIVE DISEASES Pozdyshev D. V., Medvedeva M. V., Muronetz V.I. | 105 |

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-97-98

«ИНЬ-ЯН»-ГЕНЫ В ОНКОПАТОЛОГИИ, ШИЗОФРЕНИИ И АУТИСТИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВАХ

Т.В.Буткова, К.А.Мальсагова, А.А.Степанов, А.А.Синицына, А.А.Изотов, А.Л.Кайшева

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии В.Н. Ореховича, Москва, Россия
109028, Москва, Большой Николоворобинский пер., 7, стр. 5
e-mail: t.butkova@gmail.com

Был проведен анализ научных исследований, которые характеризуют гены, ассоциированные с развитием заболеваний с обратной коморбидностью, включая шизофрению, расстройства аутистического спектра и наиболее распространенные онкопатологии. Выделена группа общих 10 «инь-ян»-генов, которые могут быть ассоциированы с развитием как психических, так и онкологических заболеваний.

Ключевые слова: шизофрения, аутистические расстройства, «инь-ян»-гены

Связность заболеваний, их сочетание, возможность одновременного появления характеризуют феномен прямой коморбидности, при котором наблюдается сочетанное развитие комплекса болезней у пациента, а также обратной коморбидности для патологий, которые редко одновременно встречаются у одного человека [1, 2]. Онкологические и психические заболевания относят к феномену обратной коморбидности. Так, согласно литературным данным субъекты с психическими недугами реже страдают онкологическими заболеваниями по сравнению с общей популяцией. Актуальным представляется изучение биологических процессов, ассоциированных с развитием заболеваний с обратной коморбидностью, включая психические (шизофрения, расстройства аутистического спектра) и онкологические (рак толстого кишечника, почки, молочной железы и яичников) [2].

На сегодня аннотировано чуть более 21000 белок-кодирующих генов в геноме человека, среди них в постгеномных базах данных около 1200 генов ассоциированы с развитием шизофрении, более 250 генов – с развитием расстройства аутистического спектра и несколько тысяч генов – с развитием онкопатологий.

Больше всего онкогенов в геномных базах данных (Genecards, Uniprot, NCBI/Gene, STRING) аннотированы в качестве кандидатных для рака молочной железы, рака легких и колоректального рака – около 2000 генов, для рака простаты и шизофрении – около 1500 генов.

Наиболее сходны по генетическим факторам онкопатологии. Интересно, что выявлено около 400 совпадений для генов, ассоциированных с развитием онкопатологий и шизофрении.

Факт отсутствия резкого увеличения заболеваемости раком и даже сниженная частота онкопатологий по сравнению с общей популяцией позволяют предположить, что патогенез психических заболеваний может подавлять развитие онкологических процессов, в первую очередь опухолеобразование. Одним из возможных объяснений взаимоисключения психических заболеваний и онкологии является общий механизм, регулирующий переключение из состояния клеточной смерти (фенотип шизофрении) в состояние выживаемости и деления (фенотип онкопатологии). В результате транскрипционного мета-анализа было обнаружено 10 общих генов, ассоциированных с развитием как психических заболеваний, так и онкопатологии (AKT1, NRG, COMT, CTNNA3, p53, Wnt-1, MET, PTEN, PCDH10, PTEN) [3]. Однако наблюдается дифференциальная экспрессия для этих генов при онкопатологиях и психических заболеваниях. Различен механизм функционирования общих генов и их биологическая роль для заболеваний с обратной коморбидностью.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-14-00298.

Литература

1. Пузырев В.П. Генетические основы коморбидности у человека // *Генетика*. – 2015. – №51. – С. 491-502.
2. Tabarés-Seisdedos R, Rubenstein J. Inverse cancer comorbidity: a serendipitous opportunity to gain insight into CNS disorders // *Nat Rev Neurosci*. – 2013. – №14. – С. 293-304.
3. Буткова Т.В., Мальсагова К.А., Степанов А.А., Костюк Г.П., Захарова Н.В., Бравве Л.В., Синицына А.А., Изотов А.А., Кайшева А.Л. «Инь-ян»-гены в онкопатологии, шизофрении и аутистических расстройствах // *Вопросы практической педиатрии*. – 2019. – №14. – С. 37-46.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-97-98

YIN-YANG GENES IN CANCER, SCHIZOPHRENIA AND AUTISM SPECTRUM DISORDERS

T.V.Butkova, K.A.Malsagova, A.A.Stepanov, A.A.Sinitsyna, A.A.Izotov, A.L.Kaysheva

V.N.Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russian Federation
109028, Moscow, 7/5 Bol'shoi Nikolovorobinskiy ul., 7/ 5
e-mail: t.butkova gmail.com

Literature review focuses on the genes associated with the development of diseases with inverse comorbidity, including schizophrenia, autism spectrum disorders, and most common cancers was carried out. The present study summarizes the information on 10 yin-yang genes that can be associated with both mental disorders and cancer.

Key words: schizophrenia, autism spectrum disorders, yin-yang genes

The connectedness of diseases, their combination, the possibility of simultaneous occurrence characterize the phenomenon of comorbid pathology, in which the patient undergoes a combined development of a complex of diseases, as well as reverse comorbidity for pathologies rarely encountered simultaneously in one person [1, 2]. Oncological and mental diseases are referred to the phenomenon of inverse comorbidity. Thus, according to published data, subjects with mental illness are less likely to suffer from cancer compared to the general population. It seems relevant to study the biological processes associated with the development of diseases with reverse comorbidity, including mental (schizophrenia, autism spectrum disorders) and oncological (cancer of the large intestine, kidney, breast and ovary) [2].

To date, a little more than 21,000 protein-coding genes in the human genome have been annotated, among them in postgenomic databases, thousands of genes are associated with the development of various oncopathologies and a little more than 1200 genes are associated with the development of schizophrenia, more than 250 genes are associated with the development of an autism spectrum disorder.

Most oncogenes in genomic databases (Genecards, Uniprot, NCBI / Gene, STRING) are annotated as candidates for breast cancer, lung and colorectal cancer - about 2000 genes, for prostate and schizophrenia – about 1,500 genes.

The most similar on genetic factors of oncopathology. Interestingly, about 400 matches were found for genes associated with the development of oncopathologies and schizophrenia.

The fact of the absence of a sharp increase in the incidence of cancer and even the reduced frequency of oncopathologies compared with the general population suggest that the pathogenesis of mental diseases can inhibit the development of oncological processes, primarily tumor formation. One of the possible explanations for the mutual exclusion of mental illness and oncology is the general mechanism that regulates the switch from the state of cell death (phenotype of schizophrenia) to the state of survival and division (phenotype of oncopathology). A transcriptional meta-analysis revealed 10 common genes associated with the development of both mental illness and cancer pathology (AKT1, NRG, COMT, CTNNB, p53, Wnt-1, MET, PTEN, PCDH10, PTEN). However, differential gene expression is observed in oncopathology and mental illness. The mechanism of functioning of these genes and their biological role for diseases with reverse comorbidity are different.

The research was carried out with financial support from the Russian Science Foundation, grant no. 19-14-00298.

References

1. Puzyrev V.P. *The genetic basis of comorbidity in humans // Genetics.* – 2015. – №51. – С. 491-502.
2. Tabarés-Seisdedos R, Rubenstein J. *Inverse cancer comorbidity: a serendipitous opportunity to gain insight into CNS disorders // Nat Rev Neurosci.* – 2013. – №14. – С. 293-304.
3. Butkova T.V., Malsagova K.A., Stepanov A.A., Kostyuk G.P., Zakharova N.V., Bravve L.V., Sinitsyna A.A., Izotov A.A., Kaysheva A.L. *"Yin-yang" genes in oncopathology, schizophrenia and autistic disorders // Questions of practical pediatrics.* – 2019. – №14. – С. 37–46.

УДК 57.085.23 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-99-100

РАЗРАБОТКА *IN VITRO* МОДЕЛИ GNAO1-ЭНЦЕФАЛОПАТИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНЫХ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ

Лунев Е.А.^{1,2,3}, Лучкина Е.А.^{1,2}, Савченко И.М.^{1,2}, Веляев О.А.^{1,2}, Логинов В.А.^{1,2}, Поликарпова А.В.^{1,2}, Васильева С.Г.^{1,2}, Егорова Т.В.^{1,2}, Бардина М.В.^{1,2,3}

¹ Институт биологии гена, Российской академии наук, 119334, Москва, Россия

² Marlin Biotech, 143026, Москва, Россия

³ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, 119334, Москва, Россия
email: e.lunev.marlin@gmail.com

Представлены результаты тестирования рекомбинантных аденоассоциированных вирусов на первичной нейрональной культуре для создания модели GNAO1-энцефалопатии. Продемонстрирована нейрональная экспрессия мутантной и дикой формы трансгенного GNAO1. Показана возможность снижения вдвое экспрессии эндогенного GNAO1 в нейронах методом РНК-интерференции.

Ключевые слова: GNAO1-энцефалопатия, орфанные заболевания, AAV векторы, моделирование *in vitro*

Ген GNAO1 экспрессируется преимущественно в центральной нервной системе и кодирует альфа-субъединицу G-белка (Gαo1). GNAO1-ассоциированная энцефалопатия является моногенным орфанным заболеванием, вызванным *de novo* мутациями в соответствующем гене. Клинический миссенс-вариант с.607G>A является одной из наиболее частых мутаций GNAO1 и имеет патологическое проявление в виде эпилепсии и двигательной дисфункции в младенческом возрасте. Молекулярный механизм GNAO1-ассоциированной патологии по-прежнему остается неизвестным, что затрудняет подбор фармакологических препаратов и разработку генной терапии. В частности, не установлено, приводит ли мутация с.607G>A к образованию белка с токсичным проявлением или же заболевание развивается вследствие дефицита функционального белка Gαo1. С целью моделирования заболевания на нейрональных клетках, ранее нами были разработаны конструкции на основе аденоассоциированных вирусов (AAV) [1]. Для проверки токсичности белкового продукта GNAO1 с.607G>A в вирусные векторы были заклонированы мутантная или здоровая формы Gαo1, меченые flag- и мус-эпитопами. Для моделирования дефицита функционального белка, в вектор AAV-shRNA была клонирована короткая шпилечная РНК, таргетирующая эндогенный GNAO1-транскрипт и снижающая экспрессию Gαo1. В настоящей работе мы наработали и очистили в иодиксаноловом градиенте рекомбинантные вирусные частицы серотипа DJ. Отсутствие белковых примесей оценивалось анализом вирусного препарата в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием серебром. Первичную нейрональную культуру мышей заражали полученными гAAV при множественности инфекции 105 геномных копий на клетку. Экспрессия мутантной и здоровой формы белка Gαo1 в зараженных нейронах была продемонстрирована методом вестерн-блоттинга с использованием специфичных к эпитопам антител. Снижение экспрессии в два раза эндогенного GNAO1 с помощью AAV/DJ-shRNA показали методом ПЦР в реальном времени и вестерн-блоттинга. Таким образом, используя вирусную инфекцию, мы добились эффективной доставки экспрессионных кассет для оверэкспрессии и подавления гена GNAO1 в мышечных нейронах. Изучение функциональной активности нейронов, в предложенной модели, приведет к пониманию молекулярных механизмов GNAO1 энцефалопатии и поможет в разработке подходов персонализированной медицины.

Литература

1. Development of adeno-associated virus vectors as a tool for the GNAO1-related encephalopathy modeling. Evgenii Lunev, Svetlana Vassilieva, Valeriya Shlyk, Anna Shmidt, Tatiana Egorova, Maryana Bardina. Neurogenetics. Nature conferences virtual meeting 2020.

UDC 57.085.23 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-99-100

IN VITRO GNAO1-ENCEPHALOPATHY MODEL DEVELOPMENT USING RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUSES

Lunev E.A.^{1,2,3}, Luchkina E.A.^{1,2}, Savchenko I.M.^{1,2}, Velyaev O.A.^{1,2}, Loginov V.A.^{1,2}, Polikarpova A.V.^{1,2}, Vassilieva S.G.^{1,2}, Egorova T.V.^{1,2}, Bardina M.V.^{1,2,3}

¹ Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334, Moscow, Russia

² Marlin Biotech, 143026, Moscow, Russia

³ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334, Moscow, Russia
email: e.lunev.marlin@gmail.com

Our study presents the verification of recombinant adeno-associated viruses on primary neuronal culture for GNAO1-encephalopathy modeling. We demonstrated neuronal expression of transgenic mutant and wild-type forms of the GNAO1. Downregulation by two-fold of the endogenous GNAO1 in neurons was achieved using RNA interference approach.

Key words: GNAO1-encephalopathy, orphan diseases, rAAV, *in vitro* modeling

The GNAO1 gene is expressed primarily in the central nervous system and encodes the alpha subunit of the G-protein (Gα1). GNAO1-associated encephalopathy is a monogenic orphan disease caused by *de novo* mutations in the GNAO1. Clinical missense variant c.607G>A is one of the most frequent mutations of GNAO1 that causes infantile epilepsy and movement disorder. The molecular mechanism of GNAO1-associated pathology is still unknown, which complicates the selection of pharmacological drugs as well as the development of gene therapy. In particular, it has not been determined whether the c.607G>A mutation leads to the production of a toxic protein or the cause of the disease is a deficiency of the endogenous Gα1. Previously, we developed a set of recombinant adeno-associated viruses (AAV) for GNAO1-encephalopathy modeling on a primary neuronal culture [1]. To test the toxicity of the GNAO1 c.607G>A, we assembled AAV-GNAO1 vector encoding flag- and myc- tagged mutant or wild-type of Gα1 protein. To test a protein deficiency, a short hairpin RNA targeting GNAO1 was cloned into AAV vector to downregulate Gα1 expression. In the present study, we produced and purified recombinant viral particles of the DJ serotype in the iodixanol gradient. The purity of the viral preparation was evaluated by silver staining in a polyacrylamide gel. We infected a primary neuronal culture with rAAVs at the multiplicity of infection 105 genomic copies per cell. Overexpression of the mutant and wild-type of the Gα1 was demonstrated by Western blot using tag-specific antibodies. We determined downregulation of endogenous GNAO1 by two-fold by real-time PCR and Western blot. Thus, using viral infection, we achieved efficient delivery of expression cassettes into mouse neurons for overexpression and suppression of the GNAO1 gene. Functional assays on the proposed model will improve our understanding of the molecular mechanisms of GNAO1 encephalopathy, and will aid the development of the personalized medicine approaches.

References

1. Development of adeno-associated virus vectors as a tool for the GNAO1-related encephalopathy modeling. Evgenii Lunev, Svetlana Vassilieva, Valeriya Shlyk, Anna Shmidt, Tatiana Egorova, Maryana Bardina. Neurogenetics. Nature conferences virtual meeting 2020.

УДК 616.8-056.76 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-101-102

СОЗДАНИЕ АДЕНО-АССОЦИИРОВАННЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ GNAO1-ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Е.А. Лучкина^{1,2}, Е.А. Лунев^{1,2,3}, А.А. Шмидт^{1,2,3}, А.Ю. Хаматова^{1,2}, Д.В. Цвиркун^{1,2}, М.В. Бардина^{1,2,3}

¹ Институт биологии гена, Российской академии наук, 119334, Россия, город Москва, улица Вавилова, дом 34/5

² ООО «Марлин Биотех», 143026, Россия, Москва, территория Сколково инновационного центра, улица Нобеля, дом 7, офис помещение 69

³ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, 119334, Россия, город Москва, улица Вавилова, дом 34/5

e-mail: e.luchkina.marlin@gmail.com

Разработаны генетические конструкции на основе коротких шпилечных РНК, доставляемые в клетки адено-ассоциированными вирусными частицами, как потенциальный генотерапевтический препарат для лечения наследственной GNAO1-энцефалопатии.

Ключевые слова: генная терапия, адено-ассоциированные вирусы, короткие шпилечные РНК, РНК интерференция, GNAO1-энцефалопатия, эпилепсия.

GNAO1-энцефалопатия - редкое генетическое заболевание с нарушением развития нервной системы, вызванное мутациями в гене GNAO1. Миссенс-мутация с.607 G>A имеет доминантное проявление и, вероятно, приводит к образованию токсичного белкового продукта. Клиническая картина характеризуется ранним началом эпилепсии и симптомами двигательного расстройства у пациентов.

Ранее нами была предложена стратегия генной терапии для варианта GNAO1 с.607G>A, направленная на аллель-специфическое подавление мутантной копии гена [1]. Был произведен скрининг коротких шпилечных РНК (shRNA), индуцирующих селективное подавление мутантного транскрипта GNAO1 по механизму РНК интерференции, и были выбраны перспективные последовательности. Целью настоящей работы является создание и тестирование в клеточной системе рекомбинантных адено-ассоциированных вирусов (AAV), несущих shRNA для подавления GNAO1 с мутацией с.607G>A.

Были созданы 4 генетические конструкции на основе AAV-векторов: две конструкции с shRNA для селективного подавления GNAO1, а также контрольные конструкции для неселективного подавления GNAO1 и с рандомизированной последовательностью. Первоначальная проверка AAV-shRNA конструкций проводилась в контексте плазмидной трансфекции клеток, транзientно экспрессирующих здоровую и мутантную копии гена GNAO1, меченых пептидными тагами. Методом Вестерн-блот было показано, что неселективная конструкция AAV-shGNAO1 приводит к снижению общего уровня GNAO1 в клетках, в то время как векторы с селективными shGNAO1 специфически снижают экспрессию мутантного гена, не влияя существенно на уровень экспрессии здорового аллеля. На следующем этапе была произведена продукция рекомбинантных вирусных частиц серотипа DJ путем тройной трансфекции HEK293T и очистка в ступенчатом градиенте иодиксанола. Эффективность сборки и очистки gAAV/DJ-shRNA проводилась методом количественного ПЦР с использованием праймеров и зондов к инвертированным концевым повторам (ITR) вирусного генома. Была отмечена тенденция к снижению эффективности сборки gAAV, содержащих шпилечные shRNA, в сравнении с контрольными препаратами вируса. Функциональную активность AAV-shGNAO1 подтверждали путём заражения стабильных линий клеток, экспрессирующих здоровый и мутантный вариант GNAO1.

Таким образом, нами были разработаны векторы на основе AAV в качестве потенциального генотерапевтического препарата для лечения GNAO1 энцефалопатии. Следующим шагом нашей работы является проверка эффективности gAAV-shGNAO1 в функциональных тестах на нейрональных клетках, полученных из фибробластов пациента, а также проверка токсичности препарата в мышинной модели с гуманизированным участком GNAO1.

Литература

1. Bardina M.V., Polikarpova A.V., Loseva E.M., Vassilieva S.G., Egorova T.V. RNAi-based gene therapy approach for GNAO1-related neurodevelopmental disorder// Human Gene Therapy. 2019. Vol.30. Issue 11. P270.

UDC 616.8-056.76 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-101-102

AAV VECTOR DEVELOPMENT FOR GENE THERAPY OF GNAO1 ENCEPHALOPATHY

E.A. Luchkina^{1,2}, E.A. Lunev^{1,2,3}, A.A. Shmidt^{1,2,3}, A.Y. Khamatova^{1,2}, D.V. Tsvircun^{1,2}, M.V. Bardina^{1,2,3}

¹ IGB RAS, 119334, Moscow, Vavilova street, 34/5

² Marlin Biotech LLC, 143026, Moscow, Skolkovo Innovation Centre, Nobel street, 7, office 69

³ Centre for High-Sensitive Edition and Genetic Technology for Biomedicine (CHSEGTB), IGB RAS, 119334, Moscow, Vavilova street, 34/5

e-mail: e.luchkina.marlin@gmail.com

shRNA-based genetic constructs, delivered to cells by AAV, have been developed as a potential gene therapy treatment for GNAO1 encephalopathy.

Key words: gene therapy, adeno associated virus, AAV, short hairpin RNA, shRNA, RNA interference, RNAi, GNAO1 encephalopathy, epilepsy.

GNAO1 encephalopathy is a rare genetic neurodevelopmental disease caused by mutations in GNAO1 gene. The dominant-negative missense mutation c.607G>A probably leads to the toxic protein production. The clinical manifestation is characterized by early onset of epilepsy and movement disorder in patients. Previously, we suggested an allele-specific gene therapy strategy for GNAO1 c.607G>A to suppress the mutant gene copy [1]. We screened short hairpin RNAs (shRNA) that induce selective suppression of the mutant GNAO1 transcript by RNA interference; the set of promising sequences was selected. The aim of this work is the development of recombinant adeno associated viruses (AAV) carrying shRNAs to suppress GNAO1 c.607G>A and testing these AAVs in the cell culture-based assay.

We composed 4 genetic constructs based on AAV vectors: two shRNA for selective GNAO1 suppression, one control construct for non-selective GNAO1 suppression and one with scrambled sequence. The initial validation of AAV-shRNA constructs was carried out in the context of plasmid transfection of cells transiently expressing a healthy and mutant copies of GNAO1 labeled with peptide tags. Western blotting analysis demonstrated that non-selective AAV-shGNAO1 leads to a decrease in the total level of GNAO1, while selective AAV-shGNAO1s specifically reduce the expression of mutant allele, without significantly affecting the wt allele. Next, the rAAV-DJ were produced by triple transfection of HEK293T cells and purified by iodixanol density gradient ultracentrifugation. Assembly and purification efficiency of rAAV/DJ-shRNA was performed by qPCR using primers and probes to inverted terminal repeats (ITR) of viral genome. There was a tendency towards a decrease in the assembly efficiency of rAAV containing hairpin shRNAs in comparison with control viruses. The functional activity of rAAV-shGNAO1 was confirmed by infecting stable cell lines expressing the wt and mutant GNAO1 variants.

Thus, we have developed vectors based on AAV as a potential gene therapy drug for the treatment of GNAO1 encephalopathy. Our next step will be testing the therapeutic effect of rAAV-shGNAO1 on patient's fibroblasts derived neurons, as well as testing the toxicity of these drugs on a mouse model with a humanized GNAO1 region.

References

1. Bardina M.V., Polikarpova A.V., Loseva E.M., Vassilieva S.G., Egorova T.V. RNAi-based gene therapy approach for GNAO1-related neurodevelopmental disorder// *Human Gene Therapy*. 2019. Vol.30. Issue 11. P270.

УДК 615.322 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-102-104

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ 3,4-ДИМЕТОКСИКОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ НА ПАТОЛОГИЧЕСКУЮ АГРЕГАЦИЮ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА

Медведева М.В., Барина К.В., Мельникова А.К., Муронец В.И.

ФББ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

119234, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы МГУ 1, стр. 73

e-mail: maryshick@mail.ru

Протестированы 9 производных 3,4-диметоксикоричной кислоты (3,4-ДМКК) на способность ингибировать

агрегацию α -синуклеина. Показано, что самыми эффективными являются феруловая, 3-метокси-4-ацетамидоксикоричная кислоты и 3,4-ДМКК, остальные соединения практически не влияют на агрегацию.

Ключевые слова: производные 3,4-диметоксикоричной кислоты, α -синуклеин, фибриллизация, болезнь Паркинсона, амилоид.

α -Синуклеин – растворимый белок, экспрессирующийся в центральной нервной системе, способный формировать структуры богатые β -складчатыми слоями, из которых образуются крупные белковые агрегаты, называемые тельцами Леви [1], формирование которых является основным признаком возникновения болезни Паркинсона [2].

Поиск веществ, влияющих на агрегацию α -синуклеина, потенциально может помочь в разработке лекарств против болезни Паркинсона. Некоторые полифенолы, такие как куркумин, ресвератрол и галлат эпигаллокатехина (в больших количествах содержащиеся в чае), обладают антиамилоидной активностью и эффективны при лечении болезни Альцгеймера [3]. Однако нестабильность и плохая растворимость данных соединений затрудняют производство лекарственных средств на их основе. Многие производные гидроксикоричных кислот, включая 3,4-ДМКК, содержатся в кофейных зёрнах.

Согласно результатам опытов с флуоресценцией тиофлавина Т наибольшим ингибирующим эффектом обладают 3,4-ДМКК и феруловая кислота в случае как фибриллизации α -синуклеина, так и «сидинга» - фибриллизации в присутствии «затравки». С помощью методов молекулярного моделирования были предсказаны сайты связывания лигандов с молекулой белка. Методами кругового дихроизма и сканирующей ион-проводящей микроскопии получена структура образуемых агрегатов; также показано, что фибриллы, выращенные в присутствии лигандов, более подвержены гидролизу протеиназой К. Более того, выбранные производные 3,4-ДМКК не обладают токсичностью по отношению к SH-SY5Y линии клеток нейробластомы человека даже при максимальной использованной концентрации ингибиторов - 1380 мкМ.

Таким образом, среди исследованных соединений наибольший ингибирующий эффект на фибриллизацию α -синуклеина оказывают феруловая, 3-метокси-4-ацетамидоксикоричная, 3,4-ДМКК кислоты, равно как и кофейные экстракты. Ингибирующее действие лигандов имеет дозозависимый характер, константы полумаксимального ингибирования составляют для феруловой кислоты 13 ± 2 мкМ, для 3-метокси-4-ацетамидоксикоричной кислоты - 50 ± 2 мкМ и для 3,4-ДМКК – 251 ± 41 мкМ. Согласно данным, полученным при помощи сканирующей ион-проводящей микроскопии, фибриллы/агрегаты α -синуклеина, выращенные в присутствии феруловой кислоты, имеют наименьший размер.

Данная работа была поддержана РФФИ (грант № 19-34-80004).

Литература

1. Giráldez-Pérez R.M., Antolín-Vallespín M., Muñoz M.D., Sánchez-Capelo A., *Models of α -synuclein aggregation in Parkinson's disease*// *Acta Neuropathol. Commun.*-2014. vol. 2, no. 1, pp. 1–17.
2. Bridi J., Hirth F., *Mechanisms of α -Synuclein induced synaptopathy in parkinson's disease*// *Front. Neurosci.*-2018. vol. 12, no. FEB, pp. 1–18.
3. Davinelli S., Sapere N., Zella D., Bracale R., Intrieri M., Scapagnini G., *Pleiotropic Protective Effects of Phytochemicals in Alzheimer's Disease*// *Oxid Med Cell Longev.*- 2012. 2012:386527.

UDC 615.322 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-102-104

THE EFFECT OF 3,4-DIMETHOXYCINNAMIC ACID DERIVATIVES ON PATHOLOGICAL AGGREGATION OF ALPHA-SYNUCLEIN

Medvedeva M.V., Barinova K.V., Melnikova A.K., Muronetz V.I.

Faculty of bioengineering and bioinformatics Lomonosov MSU, Moscow, Russia
119234, Moscow, 1-73 Leninskie Gory
e-mail: maryshick@mail.ru

3,4-dimethoxycinnamic acid (3,4-DMCA) derivatives were tested for their ability to inhibit the aggregation of α -synuclein. It was shown that the most effective inhibitors among the selected ones are ferulic, 3-methoxy-4-acetamidoxycinnamic, 3,4-DMCA, the rest of the compounds have imperceptible effect on the aggregation.

Key words: 3,4-dimethoxycinnamic acid derivatives, α -synuclein, fibrillation, Parkinson's disease, amyloid.

α -Synuclein is a soluble protein expressed in the central nervous system. Under certain conditions, a protein can form structures rich in β -sheet layers, from which large protein aggregates, called Lewy bodies, are formed [1]. The formation of these protein complexes is the main symptom of Parkinson's disease [2].

The search for substances that can affect the aggregation of α -synuclein could potentially help in the development of drugs against Parkinson's disease. Several polyphenols such as curcumin, resveratrol and epigallocatechin gallate (found in large amounts in tea) have been shown to have anti-amyloid activity and are effective in the treatment of Alzheimer's disease [3]. However, the instability and poor solubility make it difficult to create drugs based on these compounds. Many hydroxycinnamic acid derivatives, including 3,4-dimethoxycinnamic acid (3,4-DMCA), are found in coffee beans.

According to the results of the experiments with thioflavin T fluorescence, 3,4-DMCA and ferulic acid have the greatest inhibitory effect in case of both α -synuclein fibrillation and «seeding» - fibrillation in the presence of a «seed». Molecular modelling methods were used to predict the binding sites of the ligands with the protein molecule. The circular dichroism and scanning ion-conducting microscopy showed the structure of the fibrils formed in the presence of the selected compounds. Moreover, the selected 3,4-DMCA derivatives are not toxic towards the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line even at the maximum concentration of inhibitors used - 1380 μ M.

Thus, it has been shown that among the studied compounds, ferulic acid, 3-methoxy-4-acetamidoxycinnamic acid, 3,4-DMCA, as well as coffee extracts, possess inhibitory effect on α -synuclein fibrillation. The inhibitory effect of the selected ligands is dose-dependent, the half-maximum inhibition constant for ferulic acid is $13 \pm 2 \mu$ M, for 3-methoxy-4-acetamidoxycinnamic acid - $50 \pm 2 \mu$ M, and for 3,4-DMCA - $251 \pm 41 \mu$ M. According to the data obtained using scanning ion-conducting microscopy, α -synuclein fibrils/aggregates grown in the presence of ferulic acid are the smallest.

This study was supported by the RFBR (the grant № 19-34-80004).

References

1. Giráldez-Pérez R.M., Antolín-Vallespín M., Muñoz M.D., Sánchez-Capelo A., *Models of α -synuclein aggregation in Parkinson's disease// Acta Neuropathol. Commun.*-2014. vol. 2, no. 1, pp. 1–17.
2. Bridi J., Hirth F., *Mechanisms of α -Synuclein induced synaptopathy in parkinson's disease// Front. Neurosci.*-2018. vol. 12, no. FEB, pp. 1–18.
3. Davinelli S., Sapere N., Zella D., Bracale R., Intrieri M., Scapagnini G., *Pleiotropic Protective Effects of Phytochemicals in Alzheimer's Disease// Oxid Med Cell Longev.*- 2012. 2012:386527.

УДК 577.29 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-104-106

ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ САЙТОВ РЕДАКТИРОВАНИЯ РНК ГЕНОВ ЕСТЕСТВЕННО-РАЗВЕРНУТЫХ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Поздышев Д.В., Медведева М.В., Муронец В.И.

НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия,
119992, Ленинские горы, дом 1, стр. 40
e-mail: denispoz@gmail.com

Проведен поиск генов, содержащих тирозиновые кодоны с потенциалом к редактированию РНК аденозиндезаминазами, среди генов естественно-развернутых белков, связанных с нейродегенерацией, проведена проверка подобных сайтов для гена альфа-синуклеина в клеточной линии SH-SY5Y.

Ключевые слова: альфа-синуклеин, редактирование РНК

Патогенез болезни Паркинсона сопряжен с образованием белковых агрегатов в нейронах компактного слоя черной субстанции. Альфа-синуклеин является обязательным компонентом таких агрегатов и механизмы их образования до конца не ясны. При этом известно, что замены аминокислотных остатков тирозина на цистеины в полипептидной цепи альфа-синуклеина приводят к повышению цитотоксичности этого белка [1]. Также в научной литературе указывают на наличие димеров альфа-синуклеина при вестерн-блот анализе клеточных лизатов [2]. Было выдвинуто предположение, что указанные факты могут быть объяснены редактированием РНК с заменой аденозина на инозин для тирозиновых кодонов альфа-синуклеина, что приводит к несинонимичной замене Tug-Cys. Для проверки данной гипотезы из клеток нейробластомы SH-SY5Y, стабильно экспрессирующих альфа-синуклеин дикого типа и мутантный

альфа-синуклеин A53T [3], а также нетрансформированных клеток в качестве контроля, была выделена тотальная РНК. Далее была проведена реакция обратной транскрипции и с помощью специфических праймеров были амплифицированы фрагменты кДНК альфа-синуклеина, содержащие тирозиновые кодоны. После очистки образцы были секвенированы методом Сэнгера. По результатам анализа, в клеточной линии SH-SY5Y замена нуклеотидов не детектируется.

Далее было решено провести поиск потенциальных сайтов редактирования РНК по типу «UAC-UGC» среди других генов, кодирующих естественно-развернутые белки. Известно, что для того, чтобы подвергнуться модификации аденозиндезаминазами человека (ADAR1 и ADAR2), нуклеотид должен находиться в двухцепочечном участке РНК. В связи с этим был создан алгоритм поиска комплементарных участков в последовательности мРНК в области 200 пар оснований в окрестности кодона ТАС. Данный алгоритм был применен на выборке генов человека со всеми возможными сплайсинговыми моделями и выявил 1013 потенциальных генов-мишеней для ADAR. Белки, кодируемые данными генами, проверяли на наличие естественно-развернутых участков с помощью специализированной базы данных <https://www.disprot.org/>. Всего таким методом было найдено 19 белков, два из них связаны с нейрогенезом - это белки Protein numb homolog и Paired box protein Pax-6.

Еще один ген, кодирующий белок с потенциальной заменой тирозина на цистеин и содержащий неструктурированные участки, был найден при пересечении записей из баз данных о сайтах редактирования РНК RADAR (<http://rnaedit.com/about/>) и баз естественно-развернутых белков DisProt (<https://www.disprot.org/>) и IDEAL (<http://www.ideal.force.cs.is.nagoya-u.ac.jp/IDEAL/>). Это ген SEP4, кодирующий септин 4, который, как и альфа-синуклеин, входит в состав телец Леви.

Для перечисленных генов необходима последующая экспериментальная проверка найденных сайтов редактирования РНК, а также изучение склонности к агрегации мутантных форм кодируемых ими белков. Работа выполнена в рамках проекта РФФИ 19-04-00421.

Литература

1. Zhou W., Freed C. Tyrosine-to-cysteine modification of human alpha-synuclein enhances protein aggregation and cellular toxicity // *J Biol Chem* 2004 Mar 12;279(11):10128-35
2. Papagiannakis N. et al. Alpha-synuclein dimerization in erythrocytes of patients with genetic and non-genetic forms of Parkinson's Disease // *Neurosci Lett* 2018 Apr 13;672:145-149
3. Melnikova A. K. et al. Alpha-synuclein overexpression in SH-SY5Y human neuroblastoma cells leads to the accumulation of thioflavin S-positive aggregates and impairment of glycolysis // *Biochemistry (Moscow)* 2020; 85; 5: 604-613

UDC 577.29 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-104-106

IDENTIFICATION OF THE POTENTIAL RNA EDITING SITES FOR GENES OF INTRINSICALLY DISORDERED PROTEINS ASSOCIATED WITH NEURODEGENERATIVE DISEASES

Pozdyshev D. V., Medvedeva M. V., Muronetz V.I.

Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, 119992, Leninskie gory 1-40
e-mail: denispoz@gmail.com

A search for genes of naturally unfolded proteins associated with neurodegeneration containing tyrosine codons with the potential for editing RNA by adenosine deaminases was performed, and such sites were tested for the alpha - synuclein gene in the SH-SY5Y cell line.

Key words: alpha-synuclein, RNA editing

The pathogenesis of Parkinson's disease is associated with the formation of protein aggregates in neurons of *pars compacta* of the substantia nigra. Alpha-synuclein is a mandatory component of such aggregates and the mechanisms of their formation are not completely clear. At the same time, it is known that replacing the amino acid residues of tyrosine with cysteines in the polypeptide chain of alpha-synuclein leads to an increase in the cytotoxicity of this protein [1]. The scientific literature also indicates the presence of alpha-synuclein dimers in Western blot analysis of cell lysates [2]. It has been suggested that these facts can be explained by RNA editing with the replacement of adenosine with inosine for tyrosine codons of alpha-synuclein, that leads to a non-synonymous

replacement of Tyr-Cys. To test this hypothesis, total RNA was isolated from SH-SY5Y neuroblastoma cells that stably express wild-type alpha-synuclein and mutant alpha-synuclein A53T [3], as well as from untransformed cells as controls. Further, a reverse transcription reaction was performed and alpha-synuclein cDNA fragments containing tyrosine codons were amplified using specific primers. After purification, the samples were sequenced using the Sanger method. According to the results of the analysis, nucleotide replacement is not detected in the SH-SY5Y cell line.

Next, it was decided to search for potential RNA editing sites of the "UAC-UGC" type among other genes encoding intrinsically disordered proteins. It is known that in order to be modified by human adenosine deaminases (ADAR1 and ADAR2), the nucleotide must be located in a double-stranded RNA region. In this regard, an algorithm was created to search for complementary sites in the mRNA sequence in the region of 200 base pairs in the vicinity of the TAC codon. This algorithm was applied for human genes with all possible splicing models and 1013 potential target genes for ADAR were identified this way. Proteins encoded by these genes were checked for the presence of intrinsically disordered regions using a specialized database <https://www.disprot.org/>. A total of 19 proteins were found using this method, two of them are associated with neurogenesis - Protein numb homolog and Paired box protein Pax-6.

Another gene encoding a protein with a potential replacement of tyrosine for cysteine and containing unstructured regions was found by crossing records from the RADAR RNA editing site database (<http://rnaedit.com/about/>) and databases of intrinsically disordered proteins DisProt (<https://www.disprot.org/>) and IDEAL (<http://www.ideal.force.cs.is.nagoya-u.ac.jp/IDEAL/>). That was the SEP4 gene encoding septin 4, which, like alpha-synuclein, is a part of Levi's body.

For these genes, subsequent experimental verification of the found RNA editing sites is necessary, as well as the study of the tendency to the aggregation of mutant forms of the proteins encoded by them. The work is done in the framework of the project RFBR 19-04-00421.

References

1. Zhou W., Freed C. Tyrosine-to-cysteine modification of human alpha-synuclein enhances protein aggregation and cellular toxicity // *J Biol Chem* 2004 Mar 12;279(11):10128-35
2. Papagiannakis N. et al. Alpha-synuclein dimerization in erythrocytes of patients with genetic and non-genetic forms of Parkinson's Disease // *Neurosci Lett* 2018 Apr 13;672:145-149
3. Melnikova A. K. et al. Alpha-synuclein overexpression in SH-SY5Y human neuroblastoma cells leads to the accumulation of thioflavin S-positive aggregates and impairment of glycolysis // *Biochemistry (Moscow)* 2020; 85; 5: 604-613

ЛЕЧЕНИЕ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ПРИРОДНЫХ И РЕКОМБИНАНТНЫХ ВИРУСОВ

NATURAL AND RECOMBINANT VIRUS ONCOTHERAPY

Руководитель

С.В. Нетесов член-корреспондент РАН, профессор, д.б.н., зав. лабораторией биотехнологии и вирусологии, ФЕН НГУ /

S.V. Netyosov corresponding member of RAS, doctor of science (Biology), head of biotechnology and virology Novosibirsk State University

| | |
|--|-----|
| 1. РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ VV-GMCSF-LACT ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА Васильева Н.С., Войтова А.А., Дмитриева М.Д., Кочнева Г.В., Рихтер В.А., Кулигина Е.В. | 107 |
| RECOMBINANT VACCINIA VIRUS VV-GMCSF-LACT FOR HUMAN GLIOBLASTOMA TREATMENT Vasileva N.S., Voytova A.A., Dmitrieva M.D., Kochneva G.V., Richter V.A., Kuligina E.V. | 108 |
| 2. НОВЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВИРУС ОСПОВАКЦИНЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА – РЕЗУЛЬТАТЫ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ Кулигина Е.В., Коваль О.А., Кочнева Г.В., Рихтер В.А. | 109 |
| NOVEL VACCINIA VIRUS RECOMBINANT FOR HUMAN SOLID TUMORS THERAPY – PRECLINICAL TRIALS RESULTS Kuligina E.V., Koval O.A., Kochneva G.V., Richter V.A. | 110 |
| 3. ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА НЕОНАТАЛЬНОГО FC–РЕЦЕПТОРА (FCRN) НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК К НЕПАТОГЕННЫМ ЭНТЕРОВИРУСАМ ЧЕЛОВЕКА Ле Т. Х., Чумаков П. М. | 111 |
| INFLUENCE OF EXPRESSION OF THE NEONATAL FC-RECEPTOR (FCRN) ON THE SENSITIVITY OF THE CELLS TO NON-PATHOGENIC HUMAN ENTEROVIRUSESLe T. H., Chumakov P. M. | 112 |

УДК 578.7 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-107-109

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ VV-GMCSF-LACT ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Васильева Н.С.^{1,2}, Войтова А.А.², Дмитриева М.Д.², Кочнева Г.В.^{1,3}, Рихтер В.А.², Кулигина Е.В.^{1,2}

¹ Общество с ограниченной ответственностью «Онкостар», г. Новосибирск, Россия
630090, г. Новосибирск, ул. Инженерная, д. 23
e-mail: nataly_vas@bk.ru

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

³ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, Кольцово

Показано, что VV-GMCSF-Lact обладает высокой цитотоксической активностью и противоопухолевой эффективностью в отношении глиобластомы человека на моделях *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: глиобластома, онколитические вирусы, VV-GMCSF-Lact, стволовые опухолевые клетки глиобластомы

Глиобластома является одной из наиболее агрессивных опухолей ЦНС. Стандартная терапия глиобластомы на сегодняшний день носит лишь паллиативный характер, и поиск новых более эффективных методов лечения данного заболевания является актуальной задачей современных биомедицинских исследований.

В настоящее время виротерапия является одной из наиболее активно и успешно развивающихся областей биомедицины. В ИХБФМ СО РАН совместно с ГНЦ ВБ «Вектор» разработан рекомбинантный штамм вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact. VV-GMCSF-Lact инактивирован с помощью делеций фрагментов генов вирусных тимидинкиназы и ростового фактора, в районы которых встроены гены ГМ-КСФ и онкотоксического белка лактапина. Показана высокая цитотоксическая и противоопухолевая активность VV-GMCSF-Lact в отношении ряда линий опухолевых клеток человека и модельных опухолей человека и животных.

Целью данной работы является изучение противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении глиобластомы человека.

Показано, что VV-GMCSF-Lact обладает высокой цитотоксической активностью в отношении клеток ряда иммортализованных и персонализированных культур глиобластомы человека. На моделях опухолей U87-MG и U343-MG, подкожно трансплантированных мышам линии SCID, показана противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении глиобластомы. Индекс торможения роста опухолей составил 89,5% и 83%, соответственно. Показана способность VV-GMCSF-Lact проникать через ГЭБ как мышей-опухоленосителей, так и здоровых животных, и его способность реплицироваться в ортотопически трансплантированной опухоли U87-MG при внутривенном введении вируса.

Для оценки противоопухолевой эффективности лекарственных средств на основе цитостатиков, ориентированных на лечение солидных опухолей, обязательным условием является подбор культур клеток опухолей человека. Перспективным объектом для доклинических исследований лекарственных средств для лечения глиобластомы являются персонализированные культуры клеток, полученные из биоптатов опухолей пациентов, культивируемые в среде без сыворотки и с добавлением факторов роста. В таких условиях стволовые опухолевые клетки глиобластомы способны образовывать 3D структуры, или нейросферы, и инициировать развитие опухоли при трансплантации иммунодефицитным животным.

Для исследования противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении глиобластомы человека была получена культура клеток глиобластомы MG4, содержащая нейросферы. Методом проточной цитометрии показано, что полученная культура содержит большее количество клеток, несущих маркеры СОК CD44 и CD15 (62,5% и 26%, соответственно), по сравнению с персонализированной культурой MG4, не содержащей нейросфер (54,5% и 0,07%, соответственно). Показано, что персонализированная культура MG4 глиобластомы человека, содержащая нейросферы, способна формировать опухоли при подкожной трансплантации мышам линии SCID и, таким образом, является перспективной опухолевой моделью для оценки противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact.

UDC 578.7 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-107-109

RECOMBINANT VACCINIA VIRUS VV-GMCSF-LACT FOR HUMAN GLIOBLASTOMA TREATMENT

Vasileva N.S.^{1,2}, Voytova A.A.², Dmitrieva M.D.², Kochneva G.V.^{1,3}, Richter V.A.², Kuligina E.V.^{1,2}

¹ Oncostar Limited Liability Company, Novosibirsk, Russia
630090, Novosibirsk, Engineering street, 23
e-mail: nataly_vas@bk.ru

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" Rospotrebnadzora, Novosibirsk region, Koltsovo, Russia

VV-GMCSF-Lact has been shown to have high cytotoxic activity and antitumor efficacy against human glioblastoma in *in vitro* and *in vivo* models

Key words: glioblastoma, oncolytic viruses, VV-GMCSF-Lact, glioblastoma cancer stem cells

Glioblastoma is one of the most aggressive tumors of CNS. To date, standard glioblastoma therapy is only palliative and the search for new effective methods of glioblastoma treatment is an actual task of current biomedical research.

Nowadays, virotherapy is one of the most actively and successfully developing areas of biomedicine. Numerous anticancer agents based on recombinant oncolytic viruses are at various stages of clinical trials. A recombinant vaccinia virus VV-GMCSF-Lact has been developed at the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS together with the State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector". VV-GMCSF-Lact has been inactivated by deletions of viral thymidine kinase and growth factor gene fragments, in the regions of which GM-CSF and the oncotoxic protein lactaptin genes were inserted. The VV-GMCSF-Lact high cytotoxic and antitumor activity was shown for a number of human tumor cell lines and human and animal tumor models.

The goal of this work is to study the VV-GMCSF-Lact antitumor efficacy against human glioblastoma.

VV-GMCSF-Lact has been shown to have high cytotoxic activity against some immortalized and personalized human glioblastoma cell cultures. The VV-GMCSF-Lact antitumor efficacy against glioblastoma was demonstrated on subcutaneously transplanted U87-MG and U343-MG xenografts. The tumor inhibition rates were 89.5% and

83%, respectively. The ability of VV-GMCSF-Lact to penetrate the blood-brain barrier of both tumor-bearing mice and healthy animals and its ability to replicate in an orthotopically transplanted U87 MG tumor upon intravenous administration were shown.

A required condition to assess the antitumor efficacy of cytostatic based drugs oriented to the solid tumors treatment is the selection of cultured human tumor cells. A promising object for preclinical studies of drugs for glioblastoma treatment are personalized cell cultures obtained from biopsy samples of tumor patients and cultivated in a medium without serum and with the addition of growth factors. Under such conditions, glioblastoma cancer stem cells are able to form 3D structures, or neurospheres, and initiate tumor development during transplantation into immunodeficient animals.

As part of this study, primary cultures of human glioblastoma cells were obtained from tumor biopsies, and the VV-GMCSF-Lact oncolytic activity against cells of the obtained primary cultures *in vitro* was shown.

To study the VV-GMCSF-Lact antitumor efficacy against human glioblastoma, a MG4 glioblastoma cell culture containing neurospheres was obtained. Using flow cytometry, it was shown that the obtained cell culture contains more cells with CD44 and CD15 stem cancer cell markers (62.5% and 26%, respectively), compared with a personalized MG4 cell culture without neurospheres (54.5% and 0,07%, respectively). The personalized MG4 human glioblastoma cell culture with neurospheres was shown to form tumors during subcutaneous transplantation into SCID mice and, thus, this cell culture is a promising tumor model for evaluating the VV-GMCSF-Lact antitumor efficacy.

УДК 578.7 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-109-110

НОВЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВИРУС ОСПОВАКЦИНЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА – РЕЗУЛЬТАТЫ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Кулигина Е.В.^{1,2}, Коваль О.А.^{1,2}, Кочнева Г.В.^{1,3}, Рихтер В.А.²

¹ Общество с ограниченной ответственностью «Онкостар», г. Новосибирск, Россия
630090, г. Новосибирск, ул. Инженерная, д. 23
e-mail: kuligina@niboch.nsc.ru

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

³ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, Кольцово

Сконструирован двойной рекомбинантный штамм вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact, продуцирующий ГМ-КСФ человека и онкотоксический белок лактаптин. Доклинические исследования VV-GMCSF-Lact как противоопухолевого средства для терапии солидных опухолей человека успешно закончены. Препарат рекомендован для клинических испытаний.

Ключевые слова: онколитические вирусы, рекомбинантный вирус осповакцины, противоопухолевые средства, доклинические испытания

Онколитические вирусы (OVs) являются опухолеселективными, самореплицирующимися, многофункциональными противоопухолевыми агентами, и в настоящее время несколько десятков онколитических вирусов находятся на различных стадиях клинических испытаний.

Новый противоопухолевый препарат VV-GMCSF-Lact - двойной рекомбинантный штамм вируса осповакцины, несущий делеции генов тимидинкиназы и вирусного ростового фактора, в районы которых встроены трансгены ГМ-КСФ человека и цитотоксического пептида лактаптина, сконструирован на основе штамма Л-ИВП вируса осповакцины. Экспрессия гена ГМ-КСФ стимулирует миграцию эффекторных клеток иммунной системы в разрушенную вирусом опухоль. Лактаптин, синтезируемый в клетке, вызывает апоптоз опухолевых клеток по ранее установленному механизму.

VV-GMCSF-Lact эффективно ингибирует рост аденокарциномы молочной железы человека BT-549 и MDA-MB-231 и глиобластом U87MG и U343MG в иммунодефицитных мышах SCID. Индекс ингибирования роста опухоли для всех использованных моделей превысил 80%. Для глиобластомы U87MG в 50% случаев было обнаружено полное исчезновение опухоли.

После внутриопухолевого введения вирус интенсивно реплицируется в опухолевых клетках, распространяется по организму с кровотоком и поражает опухолевые клетки в других органах и тканях, т.е. проявляет выраженную антиметастатическую активность.

Индекс онкоселективности штамма VV-GMCSF-Lact составляет более 200 в паре культур клеток

эпителия молочной железы нормальная MCF 10A /раковая /MCF7, а уровень аттенуации превышает уровень аттенуации родительского штамма Л-ИВП более чем в 100 раз.

В течение 12 дней после внутриопухолевого введения VV-GMCSF-Lact полностью выводится из здоровых органов и тканей, оставаясь только в опухоли.

Таким образом, VV-GMCSF-Lact является самореплицирующимся лекарством эффективно подавляющим рост солидных опухолей и метастазов. Доклинические исследования противоопухолевого средства на основе VV-GMCSF-Lact успешно завершены, результаты исследований подтвердили безопасность и противоопухолевую эффективность VV-GMCSF-Lact. В настоящее время мы проводим подготовку к клиническим испытаниям препарата.

UDC 578.7 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-109-110

NOVEL VACCINIA VIRUS RECOMBINANT FOR HUMAN SOLID TUMORS THERAPY – PRECLINICAL TRIALS RESULTS

Kuligina E.V.^{1,2}, Koval O.A.^{1,2}, Kochneva G.V.^{1,3}, Richter V.A.²

¹ Oncostar Limited Liability Company, Novosibirsk, Russia
630090, Novosibirsk, Engineering street, 23
e-mail: kuligina@niboch.nsc.ru,

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" Rospotrebnadzora, Novosibirsk region, Koltsovo, Russia

A double recombinant vaccinia virus VV-GMCSF-Lact, producing human GM-CSF and oncotoxic protein lactaptin, was constructed. Preclinical studies of VV-GMCSF-Lact as an antitumor drug for human solid tumors therapy were successfully completed. The drug is recommended for clinical trials.

Key words: oncolytic viruses, recombinant vaccinia virus, antitumor drugs, preclinical studies

Oncolytic viruses are tumor-selective, self-amplifying antitumor agents and numerous oncolytic platforms are currently in clinical development. A novel anticancer drug VV-GMCSF-Lact, the double recombinant vaccinia virus, carrying the deletions of thymidine kinase and virus growth factor genes and the insertions of GM-CSF and cytotoxic peptide lactaptin genes, has been engineered from Lister strain vaccinia virus. The GM-CSF gene expression stimulates migration of the immune system effector cells to the tumor destroyed by the virus. Lactaptin, synthesized in cell, induces tumor cells apoptosis according to the mechanism established earlier.

VV-GMCSF-Lact effectively inhibits the growth of human breast cancer carcinomas BT-549, MDA-MB-231 and glioblastomas U87MG and U343MG in SCID mice. Index of tumor growth inhibition exceeds 80%. For U87MG complete elimination of the tumor was detected in 50% cases.

Virus intensively multiplies in tumor cells after intratumoral injection, spreads through the body with bloodstream and affects tumor cells in other organs and tissues, demonstrating pronounced antimetastatic activity.

The selectivity index for breast cancer cells measured in pair cancer MCF-7/normal MCF-10A for recombinant VV-GMCSF-Lact was more than 200. The VV-GMCSF-Lact attenuation is 100 times higher than that of parental Lister strain. The virus has been almost completely eliminated from the healthy organs and tissues of the body by the 12th day after intratumoral injection, staying only in tumor.

Thus, VV-GMCSF-Lact is a self-replicating drug which effectively suppresses the growth of solid tumors and metastases. The preclinical studies of VV-GMCSF-Lact have been successfully completed, the results confirm the safety and antitumor efficacy of VV-GMCSF-Lact and now we are moving to the clinical trials.

УДК 578.5 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-111-112

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА НЕОНАТАЛЬНОГО Fc-РЕЦЕПТОРА (FCRN) НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК К НЕПАТОГЕННЫМ ЭНТЕРОВИРУСАМ ЧЕЛОВЕКА

Ле Т.Х.¹, Чумаков П.М.²

¹Московский физико-технический институт, 41701, Московская обл., Долгопрудный, Институтский пер. 9.

²Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, д.32.

e-mail: lehoa@yandex.ru

В рамках данной работы было показано влияние уровней экспрессии белка неонатального fc-рецептора (fcrn) на чувствительность трансформированных и опухолевых клеток человека к 15 штаммов непатогенных энтеровирусов. Полная инактивация гена неонатального fc-рецептора FCGRT в клетках приводила к потере чувствительности к Эховирусам 1, 6, 7, 11, 12, 25, 30, энтеровирусу 75.

Ключевые слова: онколитические вирусы, энтеровирусы, вирусный онколиз, избирательная чувствительность

Вирусный онколиз – это новый подход к терапии онкологических заболеваний, основанный на использовании естественных непатогенных штаммов или генетически модифицированных вирусов, которые способны селективно реплицироваться в опухолевых клетках и вызывать преимущественно гибель злокачественных клеток, не повреждая нормальные ткани [1,2]. Чувствительность опухолей к вирусам индивидуальна из-за различной экспрессии поверхностных рецепторов. Помимо таких рецепторов как PVR, CXADR, CD55, ITGA2, SCARB2, ICAM1, недавно были получены данные о существовании еще одного рецептора, через который осуществляется интернализация многих энтеровирусов В, в том числе и разнообразных представителей Эховирусов, а также вируса Коксаки А9. Эту функцию выполняет неонатальный Fc рецептор (FcRn), состоящий из субъединицы FCGRT и цепи микроглобулина B2 (B2M) [3, 4].

Целью данной работы было изучение влияния уровней экспрессии неонатального fc-рецептора (FcRn) на чувствительность трансформированных и опухолевых клеток человека к ряду непатогенных энтеровирусов. Для определения влияния нарушения экспрессии неонатального fc-рецептора (FcRn) с помощью технологии CRISPR-Cas9 были получены клоны клеток HEK293T, C33A, H1299 с нокаутом гена неонатального fc-рецептора FCGRT. Эти линии клеток были использованы для определения потребности в данном рецепторе 16 штаммов непатогенных энтеровирусов, выделенных из кишечника здоровых детей. На данных линиях было отмечено, что нокаут гена FCGRT вызывал снижение литической активности Эховирусов 1, 6, 7, 11, 12, 25, 30, энтеровируса 75 в отношении этих клеток, а также существенное снижение уровня вирусной репродукции.

Таким образом было показано, что белок неонатальный Fc рецептор (FcRn) необходим для успешного проникновения в клетку Эховирусов 1, 6, 7, 11, 12, 25, 30 и энтеровируса 75.

Литература

1. Kaufman H. L., Frederick J. K., Andrew Z. *Oncolytic Viruses: A New Class of Immunotherapy Drugs.* // *Nature reviews. Drug discovery.* –2015. –V.14.(9). –P.642–662
2. Voroshilova M. K. *Potential use of nonpathogenic enteroviruses for control of human disease* // *Prog Med Virol.* 1989. Vol.36. P.191 –202.
3. Zhao X., Zhang G., Liu S., Chen X., Peng R., Dai L., Qu X., Li S., Song H., Gao Z., Yuan P., Liu Z., Li C., Shang Z., Li Y., Zhang M., Qi J., Wang H., Du N., Wu Y., Bi Y., Gao S., Shi Y., Yan J., Zhang Y., Xie Z., Wei W., Gao G. *F. Human Neonatal Fc Receptor Is the Cellular Uncoating Receptor for Enterovirus B.* // *Cell.* –219.–V.177. –P. 1553–1565.e16
4. Morosky S., Evans A., Lemon K., Schmus S, Bakkenist Christopher J. Coyne C. B. *The neonatal Fc receptor is a pan-ECHOvirus receptor.* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* –2019. – V.116(9). –P. 3758–3763

UDC 578.5 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-111-112

INFLUENCE OF EXPRESSION OF THE NEONATAL FC-RECEPTOR (FCRN) ON THE SENSITIVITY OF THE CELLS TO NON-PATHOGENIC HUMAN ENTEROVIRUSES

Le T.H.¹, Chumakov P. M.²

¹ Moscow Institute of Physics and Technology, 41701, Moscow Region, Dolgoprudny Institutskiy per. 9.

² Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, 119991, Moscow, Vavilova st, 32.

e-mail: lehoa@yandex.ru

In this work, the influence of the expression levels of the neonatal Fc receptor (FcRn) on the sensitivity of the human transformed and tumor cells to 15 non-pathogenic strains of human enteroviruses was shown. The Complete inactivation of the neonatal fc receptor gene FCGRT in cells led to loss of the sensitivity to Echoviruses 1, 6, 7, 11, 12, 25, 30, enterovirus 75.

Key words: oncolytic viruses, enteroviruses, viral oncolysis, selective sensitivity

Viral oncolysis is a new approach to the treatment of cancer based on the use of naturally occurring non-pathogenic strains or genetically modified viruses that can selectively replicate in and kill tumor cells without damaging normal tissues [1,2]. The sensitivity of tumors to viruses is individual due to different expression of cell surface receptors. In addition to receptors such as PVR, CXADR, CD55, ITGA2, SCARB2, ICAM1, recent data have indicated the existence of another receptor through which many enteroviruses B including various representatives of Echoviruses, as well as Coxsackie A9 virus are internalized. This function is performed by the neonatal Fc receptor (FcRn), consisting of the FCGRT subunit and the microglobulin B2 chain (B2M) [3, 4].

The aim of this work was to study the influence of the expression levels of the neonatal Fc receptor (FcRn) on the sensitivity of transformed and tumor cells to a number of non-pathogenic human enteroviruses. In order to determine the effect of the impaired expression of the human Fc-neonatal receptor we performed genomic knockouts of the FCGRT gene in HEK293T, C33A, H1299 cells using CRISPR/Cas9 technology. The knock-out cell lines were used to determine the requirement of this receptor for 16 strains of non-pathogenic enteroviruses isolated from the intestines of healthy children. It was shown that the knockout of the FCGRT gene leads a significant decrease in the lytic activity of Echoviruses 1, 6, 7, 11, 12, 25, 30, enterovirus 75 against these cell lines, as well as a significant decrease in the level of viral reproduction.

Thus, it was shown that the neonatal Fc receptor is necessary for successful penetration into the cell of Echoviruses 1F, 6, 7, 11, 12, 25, 30 and enterovirus 75.

References

1. Kaufman H. L., Frederick J. K., Andrew Z. *Oncolytic Viruses: A New Class of Immunotherapy Drugs.* // *Nature reviews. Drug discovery.* –2015. –V.14.(9). –P.642–662
2. Voroshilova M. K. *Potential use of nonpathogenic enteroviruses for control of human disease* // *Prog Med Virol.* 1989. Vol.36. P.191 –202.
3. Zhao X., Zhang G., Liu S., Chen X., Peng R., Dai L., Qu X., Li S., Song H., Gao Z., Yuan P., Liu Z., Li C., Shang Z., Li Y., Zhang M., Qi J., Wang H., Du N., Wu Y., Bi Y., Gao S., Shi Y., Yan J., Zhang Y., Xie Z., Wei W., Gao G. F. *Human Neonatal Fc Receptor Is the Cellular Uncoating Receptor for Enterovirus B.* // *Cell.* –219.–V.177.–P. 1553–1565.e16
4. Morosky S., Evans A., Lemon K, Schmus S, Bakkenist Christopher J. Coyne C. B. *The neonatal Fc receptor is a pan-ECHOvirus receptor.* // *Proc Natl Acad Sci U S A.* –2019.– V.116(9).–P. 3758–3763

НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ

NANOBIOTECHNOLOGY IN MEDICINE

Руководители

В.П. Чехонин, академик РАН, вице-президент РАН, руководитель отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ГНЦ социальной и судебной психиатрии им. В. П. Сербского, заведующий кафедрой медицинских нанобиотехнологий РГМУ /

V. P. Chekhonin academician of RAS, vice-president of RAS, head of Medical Nanobiotechnology Division of the N.I. Pirogov National Medical Research University, head of department V. P. Serbsky National Medical Research Centre of Psychiatry and Narcology

О.И. Гурина член-корреспондент РАН, профессор, д.м.н., ФГБУ "Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского" Минздрава России; Заведующая лабораторией нейрохимии / O.I. Gurina, corresponding member of RAS, professor, doctor of science (Medicine), head of the Laboratory of Neurochemistry, Serbsky Federal Medical Research Center of Psychiatry and Narcology of the Ministry of Health of the Russian Federation

| | |
|---|-----|
| 1. МОДЕЛИРОВАНИЕ ПСИХОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СИНДРОМОВ У КРЫС С ПОМОЩЬЮ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА, ВЫЗВАННОГО УЛЬТРАЗВУКОМ ПЕРЕМЕННЫХ ЧАСТОТ | |
| Абрамова О.В., Зубков Е.А., Зоркина Я.А., Морозова А.Ю., Ушакова В.М. | 117 |
| MODELING PSYCHOPATHOLOGICAL SYNDROMES IN RATS BY PRENATAL STRESS INDUCED BY VARIABLE FREQUENCY ULTRASOUND Abramova O.V., Zubkov E.A., Zorkina Ya.A., Morozova A.Yu., Ushakova V.M. | 118 |
| 2. ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ ВИРУСОВ | |
| Ахметова А.И., Яминский И.В. | 119 |
| PROBE MICROSCOPY IN RESEARCH OF VIRUSES Akhmetova A.I., Yaminsky I.V. | 119 |
| 3. ОБНАРУЖЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ | |
| Ахметова А.И., Яминский И.В. | 120 |
| DETECTION OF BIOLOGICAL AGENTS USING ELECTROMECHANICAL BIOSENSORS Akhmetova A.I., Yaminsky I.V. | 121 |
| 4. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ ПРОТИВОРАКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ | |
| Ванеев А.Н., Тимошенко Р.В., Колмогоров В.С., Чмельюк Н.С., Ямансаров Э.Ю., Петров Р.А., Ерофеев А.С., Горелкин П.В., Корчев Ю.Е., Мажуга А.Г., Клячко Н.Л. | 123 |
| TESTING THE EFFICACY OF NEW ANTICANCER CONJUGATES FOR THE TARGETED DELIVERY | |
| Vaneev A.N., Timoshenko R.V., Kolmogorov V.S., Chmelyuk N.S., Yamansarov E.Y., Petrov R.A., Erofeev A.S., Gorelkin P.V., Korchev Y. E., Majouga A.G., Klyachko N.L. | 123 |
| 5. РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ В ОНКОЛОГИИ | |
| Д.Г.Веденяпина, А.С.Сёмкина, М.А.Абакумов, В.П.Чехонин, П.В.Островерхов, М.А.Грин | 124 |
| DEVELOPMENT OF A PHOTOSENSITIZER DELIVERY SYSTEM FOR THERAPY AND DIAGNOSTICS IN ONCOLOGY | |
| D.Vedeniapina, A.Semkina, M.Abakumov, V.Chekhonin, P.Ostroverkhov, M.Grin | 125 |
| 6. РОЛЬ НЕЙТРОФИЛОВ В ДОСТАВКЕ НАНОЧАСТИЦ В ОПУХОЛЬ | |
| Вишневский Д.А., Науменко В.А., Чехонин В.П. | 127 |
| ROLE OF NEUTROPHILS IN THE DELIVERY OF NANOPARTICLE INTO THE TUMOR | |
| Vishnevskiy D.A., Naumenko V.A., Chekhonin V.P. | 128 |
| 7. СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОК ОБОНОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ В ТЕРАПИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ КИСТ СПИННОГО МОЗГА | |
| Воронова А.Д., Степанова О.В., Чадин А.В., Фурса Г.А., Карсунцева Е.К., Валихов М.П., Семкина А.С., Решетов И.В., Чехонин В.П. | 129 |
| COMPARISON OF THE EFFICIENCY OF OLFACTORY MUCOSA CELLS IN THERAPY OF POSTTRAUMATIC SPINAL CINDERS | |
| Voronova A.D., Stepanova O.V., Chadin A.V., Fursa G.A., Karsuntseva E.K., Valikhov M.P., Semkina A.S., Reshetov I.V., Chekhonin V.P. | 130 |
| 8. ВЫБОР ЭФФЕКТИВНОЙ НЕВИРУСНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ SIPNK В КУЛЬТУРЫ ММСК | |
| Е.В.Галицына, Т.Б.Бухарова, А.А.Буянова, К.С.Давыгора, Д.В.Гольдштейн | 131 |
| DECIDING ON NON-VIRAL DELIVERY SYSTEM FOR SIRNA TO MSCS | |
| E.Galitsyna, T.Bukharova, A.Buianova, K.Davygora, D.Goldshtein | 132 |

| | |
|---|-----|
| 9. НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ФАЗОВОГО ИМИДЖИРИНГА Дерюгина А.В., Золотова М.В., Иващенко М.Н., Игнатъев П.С., Метелин В.Б., Таламанова М.Н..... | 133 |
| NEW POSSIBILITIES OF STRUCTURAL MORPHOLOGICAL PECULIARITIES INVESTIGATION BY QUANTITATIVE PHASE IMAGING METHOD Deryugina A.V., Zolotova M.V., Ivashchenko M.N., Ignatiev P.S., Metelin V.B., Talamanova M.N. | 134 |
| 10. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА С ГЕПАТОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ HEPG В УСЛОВИЯХ 2D- И 3D-КУЛЬТИВИРОВАНИЯ Б.П. Челобанов, Ю.Е. Полетаева, А.В. Епанчинцева, А.В. Тупицына, Н.Б. Мосякин, Е.И. Рябчикова..... | 135 |
| INTERACTION OF GOLD NANOPARTICLES WITH HUMAN HEPATOCYTES HEPG LINE UNDER CONDITIONS OF 2D- AND 3D-CULTIVATION B.P. Chelobanov, J.E. Poletaeva, A.V. Epanchintseva, A.V. Tupitsyna, N.B. Mosyakin, E.I. Ryabchikova. | 136 |
| 11. ГИБРИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ МАГНЕТИТ-ЗОЛОТО ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ Ефремова М.В., Наленч Ю.А., Мировали Э., Гаранина А.С., Абакумов М.А., Спасова М., Ангелакерис М., Фарле М., Мажуга А.Г., Видвальд У., Клячко Н.Л. | 137 |
| HYBRID MAGNETITE-GOLD NANOPARTICLES FOR TERANOSTICS OF ONCOLOGICAL DISEASES Efremova M.V., Nalench Yu.A., Myrovali E., Garanina A.S., Abakumov M.A., Spasova M.S., Angelakeris M., Farle M., Majouga A.G., Wiedwald U., Klyachko N.L. | 138 |
| 12. МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НОРМАЛЬНЫХ И РАКОВЫХ КЛЕТКОК <i>In vitro</i> ПРИ РАЗНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ДЕУТЕРИЯ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ Злацкий И.А., Антипова Н.В., Злацкая А.В., Васильев Р.Г., Zubov Д.А., Новикова С.Н., Сыроешкин А.В. | 139 |
| MITOCHONDRIAL ACTIVITY OF NORMAL AND CANCER CELLS <i>In vitro</i> AT DIFFERENT CONCENTRATION OF DEUTERIUM IN CULTURE MEDIUM Zlatskiy I.A., Antipova N.V., Zlatska A.V., Vasylyev R.G., Zubov D.A., Novikova S.N., Syroeshkin A.V. | 140 |
| 13. ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ПРИ ЭНДОГЕННЫХ ПСИХОЗАХ Зоркина Я.А., Морозова А.Ю., Павлов К.А., Резник А.М., Костюк Г.П. | 141 |
| ASSOCIATION OF GENETIC POLYMORPHISMS WITH ENDOGENOUS PSYCHOSIS Zorkina Ya.A., Morozova A.Yu., Pavlov K.A.1, Reznik A.M., Kostuyk G.P. | 142 |
| 14. ДЛИННОЦЕПОЧЕЧНЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ (ЭЙКОНОЛ) В ДИАГНОСТИКЕ И КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ ПРИ ДИСЦИРКУЛЯТОРНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ Исаев В. А., Симоненко С.В. ... | 143 |
| DLINNOTSEPOCHECHNY FATTY ACIDS (EYKONOL) IN DIAGNOSTICS AND CORRECTION OF VIOLATIONS OF BRAIN BLOOD CIRCULATION AT DISTSIKULYATORNY ENCEPHALOPATHIES Isaev V.A., Simonenko S. V. | 145 |
| 15. ВИТАЛЬНАЯ МОРФОМЕТРИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ГОРМОНАМИ СТРЕССА Иващенко М.Н., Дерюгина А.В., Игнатъев П.С., Метелин В.Б., Белов А.А., Петров В.А. | 146 |
| VITAL MORPHOMETRY OF RBC IN THEIR INTERACTION WITH STRESS HORMONES Ivashchenko M.N., Deryugina A.V., Ignatiev P.S., Metelin V.B., Belov A.A.1, Petrov V.A. | 147 |
| 16. РАЗРАБОТКИ СОРБЦИОННО- ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ Караваева Л.И., Стучаева А.А., Глазова Н.В. | 148 |
| MODIFICATION OF HYDROLYTIC ENZYMES FROM NORTHERN DEER PANCARRIA WITH THE PURPOSE OF DEVELOPMENT OF THE SORPTION-CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR ISOLATION AND CLEANING Karavaeva L.I., Stuchaeva A.A., Glazova N.V. | 149 |
| 17. ПЕПТИДНЫЕ ПОЛЯ НА ПОЛИАНИЛИНЕ: ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ В ИЗУЧЕНИИ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПРОТЕАЗ А.В. Колесниченко, Н.А. Казьмина, Р.Г. Вахренев, М.В. Мельникова, Е.Ф. Колесанова | 151 |
| POLYANILINE-BASED PEPTIDE ARRAYS: PRODUCTION, PROPERTIES AND APPLICATION IN STUDIES OF SUBSTRATE SPECIFICITY OF PROTEASES A.Kolesnichenko, N.Kaz'mina, R.Vakhrenev, M.Melnikova, E.Kolesanova..... | 152 |
| 18. УПРАВЛЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ ЛИПИДНОГО НАНОКОНТЕЙНЕРА ДЛЯ ДОСТАВКИ ФТОРХИНОЛОНОВ Колмогоров И.М., Якимов И.Д., Ле-Дейген И.М., Скуредина А.А., Кудряшова Е.В. | 153 |
| CONTROL OF PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF A LIPID NANOCONTAINER FOR DELIVERY OF DRUGS WITH LOW BIOAVAILABILITY Kolmogorov I.M., Yakimov I.D., Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Kudryashova E. V..... | 154 |
| 19. ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛЬНЫХ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЖИВЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ИОН-ПРОВОДЯЩЕЙ МИКРОСКОПИИ Колмогоров В.С., Ванеев А.Н., Савин Н.А., Яковлев А.П., Алова А.В., Лаврушкина С.В., Ерофеев А.С., Горелкин П.В., Киреев И.И., Мажуга А.Г., Корчев Ю.Е., Новак П., Клячко Н.Л. | 154 |

| | |
|---|-----|
| STUDYING THE LOCAL MECHANICAL PROPERTIES OF LIVING CELLS VIA SCANNING ION-CONDUCTING MICROSCOPY Kolmogorov V.S., Vaneev A.N., Savin N.A., Yakovlev A.P., Alova A.V., Lavrushkina S.V., Erofeev A.S., Gorelkin P.V., Kireev I.I., Majouga A.G., Korchev Y.E., Novak P., Klyachko N.L. | 155 |
| 20. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ЭФИРОВ АСТАКСАНТИНА И ПОЛУЧЕНИЕ НАНОЭМУЛЬСИЙ НА ИХ ОСНОВЕ Куликова И.С., Лотош Н.Ю., Туранова В.А., Селищева А.А. | 156 |
| DETERMINATION OF THE FATTY ACID COMPOSITION OF ASTAXANTIN ESTERS AND OBTAINING NANOEMULSIONS ON THEIR BASIS Kulikova I.S., Lotosh N.Y., Turanova V.A., Selischeva A.A. | 157 |
| 21. РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ АФФИННОСТИ КОНЪЮГАТОВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ НА АСИАЛОГЛИКОПРОТЕИновый РЕЦЕПТОР ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ Лопухов А.В., Петров Р.А., Ямансаров Э.Ю., Бинеvский П.В., Мажуга А.Г., Клячко Н.Л. | 158 |
| DEVELOPMENT AND EVALUATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT COMPOUNDS CONJUGATES FOR ASGPR-TARGETED DRUG DELIVERY Lopukhov A.V., Petrov R.A., Yamansarov E.Yu., Binevski P.V., Majouga A.G., Klyachko N.L. | 159 |
| 22. РАЗРАБОТКА НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОЧАСТИЦ С РАДАХЛОРИНОМ В КАЧЕСТВЕ КОМПЛЕКСНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ Мирошкина А.М., Кречетов С.П., Яковцева М.Н., Бабёнышев А.В., Краснюк И.И. | 160 |
| DEVELOPMENT OF NANOSTRUCTURED POLYMERIC MICROPARTICLES WITH RADACHLORINE AS A COMPLEX DELIVERY SYSTEM FOR PHOTODYNAMIC THERAPY Miroshkina A.M., Krechetov S.P., Yakovcheva M.N., Babenechev A.V., Krasnyk I.I. | 162 |
| 23. РАЗРАБОТКА МЕТОДА СКРИНИНГА АУТОАНТИТЕЛ К NMDA-РЕЦЕПТОРАМ ПРИ ПЕРВЫХ ЭПИЗОДАХ ШИЗОФРЕНИИ И ДРУГИХ РАССТРОЙСТВ ПСИХОТИЧЕСКОГО СПЕКТРА Павлова О.В., Мурашко А.А., Павлов К.А., Гурина О.И. Шмуклер А.Б. | 163 |
| DEVELOPMENT OF A CELL-BASED ASSAY METHOD FOR SCREENING AUTOANTIBODIES TO NMDA-RECEPTORS IN THE FIRST EPISODES OF SCHIZOPHRENIA AND OTHER MENTAL DISORDERS Pavlova O.V., Murashko A.A., Pavlov K.A., Gurina O.I., Shmukler A.B. | 164 |
| 24. МИЦЕЛЛООБРАЗОВАНИЕ И ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ СИММЕТРИЧНЫХ ЛИПОФИЛЬНЫХ ПОЛИАМИНОВ Перевощицова К.А., Щеглова Е.А., Макарова Д.М., Пучков П.А., Шмендель Е.В., Маслов М.А. | 165 |
| CYTOTOXICITY AND MICELLAR PROPERTIES OF SYMMETRIC LIPOPHILIC POLYAMINES Perevoshchikova K.A., Shcheglova E.A., Makarova D.M., Puchkov P.A., Shmendel E.V., Maslov M.A. | 166 |
| 25. РЕПЕРТУАР ЦИРКУЛИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПОДТИПОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С.В.Подлесных, К.Е.Абрамова, Е.А.Колосова, В.С.Дрозд, А.А.Гордеева, Я.Н.Шойхет, А.Ф.Лазарев, С.А.Джонстон, А.И.Шаповал | 167 |
| REPertoire OF CIRCULATING ANTIBODIES FOR DIAGNOSING MOLECULAR SUBTYPES OF BREAST CANCER S.Podlesnykh, K.Abramova, E.Kolosova, V.Drozhd, A.Gordeeva, J.Shoikhet, A.Lazarev, S.Johnston3, A.Chapoval | 168 |
| 26. ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ СВЯЗУЮЩЕГО КОМПОНЕНТА КАТИОННЫХ ЛИПОСОМ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ Пучков П.А., Егоров Д.Д., Маслов М.А. | 169 |
| OPTIMIZATION OF THE TECHNOLOGY OF BINDING COMPONENT PREPARATION FOR CATIONIC LIPOSOMES IN GENE THERAPY Puchkov P.A., Egorov D.D., Maslov M.A. | 170 |
| 27. МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ С ОБОЛОЧКОЙ ИЗ АЛЬБУМИНА КАК УНИВЕРСАЛЬНАЯ НАНОПЛАТФОРМА ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ К ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМ НОВООБРАЗОВАНИЯМ Семкина А.С., Скориков А.С., Иванова А.В., Абакумов М.А., Чехонин В.П. | 171 |
| ALBUMIN-COATED MAGNETIC NANOPARTICLES AS A UNIVERSAL NANOVEHICLE FOR TARGETED DELIVERY OF DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC AGENTS TO MALIGNANT TISSUES Semkina A.S., Skorikov A.S., Ivanova A.V., Abakumov M.A., Chekhonin V.P. | 172 |
| 28. ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ В ИММУНОАНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА РАЗВЕТВЛЕННОЙ МОРФОЛОГИИ – «НАНОЦВЕТОВ» Серебренникова К.В., Петракова А.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. | 173 |
| OBTAINING AND APPLICATION IN IMMUNOANALYTIC SYSTEMS OF GOLD NANOPARTICLES WITH BRANCHED MORPHOLOGY ("NANOFLOWERS") Serebrennikova K.V., Petrakova A.V., Byzova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. | 174 |

| | |
|--|-----|
| 29. ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ АСТРОЦИТОВ RATTUS NORVEGICUS ДО И ПОСЛЕ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С КЛЕТКАМИ ГЛИОМЫ C6 А.С. Силантьев, А.А. Чернышева, О.В. Побегуц, А.Е. Носырев, Г.В. Павлова, О.И. Гурина..... | 174 |
| PROTEOMIC ANALYSIS OF ASTROCYTE CELL LINE BEFORE AND AFTER CO-COCULTIVATION WITH RATTUS NORVEGICUS GLIOMA C6 CELLS Silantyev A. S., Chernysheva A.A., Pobeguts O.V. | 175 |
| 30. МУЛЬТИСЕНСОРНАЯ ОБУЧАЕМАЯ СИСТЕМА ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЧЕЛОВЕКА В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ О.Ю.Созинова, А.Ю.Зайцева, Ю.Я.Кисляков, М.С.Мазинг, С.А.Авдюшенко | 176 |
| MULTISENSORY LEARNING SYSTEM FOR NON-INVASIVE DETERMINATION OF THE FUNCTIONAL STATE OF THE BODY IN EXTREME CONDITIONS O.Sozinova, A.Zaitseva, Y.Kislyakov, S.Avduschenko..... | 178 |
| 31. КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛ С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА КАК КОМПОНЕНТ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ДИАГНОСТИКУМОВ: ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ СИНТЕЗА НА СОСТАВ И РЕАКЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. | 180 |
| ANTIBODY CONJUGATES WITH GOLD NANOPARTICLES AS A COMPONENT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC DIAGNOSTICUMS: THE INFLUENCE OF SYNTHESIS CONDITIONS ON THE COMPOSITION AND REACTIVITY Sotnikov D.V., Byzova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. | 181 |
| 32. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОНОСИТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АУТОАНТИТЕЛ К ТИРЕОГЛОБУЛИНУ Стойнова А.М., Зубков А.В., Станишевский Я.М. | 182 |
| STUDY OF INFLUENCE OF DIFFERENT NATURE CARRIERS ON IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF IMMOBILIZED THYROGLOBULIN MONOCLONAL AUTO ANTIBODIES Stoinova A., Zubkov A., Stanishevskiy Ya. | 183 |
| 33. ЭФФЕКТЫ ЭЛЕКТРОСУДОРОЖНОЙ СТИМУЛЯЦИИ В МОДЕЛИ 6-ОНДА-ИНДУЦИРОВАННОГО ГЕМИПАРКИНСОНИЗМА Ушакова В.М., Зоркина Я.А., Зубков Е.А., Морозова А.Ю., Абрамова О.В., Каримова О.С., Чехонин В.П. | 184 |
| EFFECTS OF ELECTROCONVULSIVE STIMULATION IN RATS WITH 6-OHDA INDUCED HEMIPARKINSONISM Ushakova V.M., Zorkina Ya. A., Zubkov E.A., Morozova A. Yu., Abramova O.V., Karimova O.S., Chekhonin V.P. | 185 |
| 34. ВОДОРАСТВОРИМАЯ ПЕРРОРАЛЬНАЯ СИСТЕМА ДОСТАВКИ ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ НА ОСНОВЕ ИХ КОМПЛЕКСА С БИОПОЛИМЕРАМИ Чеботарёв С.А., Зеликина Д.В., Комарова А.П., Балакина Е.С., Пальмина Н.П., Богданова Н.Г., Антипова А.С., Мартиросова Е.И., Семёнова М.Г. | 186 |
| WATER-SOLUBLE PERRORAL DELIVERY SYSTEM OF ESSENTIAL LIPIDS BASED ON THEIR COMPLEX WITH BIOPOLYMERS Chebotarev S.A., Zelikina D.V., Komarova A.P., Balakina E.S., Palmina N.P., Bogdanova N.G., Antipova A.S., Martirosova E.I., Semenova M.G. | 187 |
| 35. РАЗРАБОТКА БЫСТРОГО ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО МЕТОДА ИММУНОБЛОТИНГА С МАГНИТНЫМИ МЕТКАМИ Шляпников Ю.М., Канев И.Л., Малахова Е.М., Шляпникова Е.А. | 188 |
| DEVELOPMENT OF FAST HIGHLY SENSITIVE IMMUNOBLOTTING METHOD WITH MAGNETIC LABELS Shlyapnikov Yu.M., Kanev I.L., Malakhova E.A., Shlyapnikova E.A. | 189 |
| 36. ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО КООРДИНАЦИОННОГО СОЕДИНЕНИЯ МЕДИ Якимова Т.М., Власова К.Ю., Красновская О.О., Клячко Н.Л. | 190 |
| ENCAPSULATION OF ANTITUMOR COPPER COMPLEX INTO LIPOSOMES Yakimova T.M., Vlasova K. Yu., Krasnovskaya O.O., Klyachko N.L. | 191 |

УДК 57.024 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-117-118

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПСИХОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СИНДРОМОВ У КРЫС С ПОМОЩЬЮ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА, ВЫЗВАННОГО УЛЬТРАЗВУКОМ ПЕРЕМЕННЫХ ЧАСТОТ

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

Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского, Москва, Россия
119034, г. Москва, Кропоткинский пер., д. 23
e-mail: abramova1128@gmail.com

Показано, что пренатальный стресс (ПС), вызванный действием ультразвука (УЗ) переменных частот, вызывает тревожное поведение и нарушает социальные и когнитивные функции у самцов крыс.

Ключевые слова: пренатальный стресс; модели психических заболеваний; шизофрения; ультразвуковое воздействие;

Известно, что стресс матери во время беременности негативно влияет на развитие эмбриона, нарушая у него функционирование мозга и таким образом, является одним из факторов развития психоневрологических расстройств у потомства. ПС связывают с такими заболеваниями, как шизофрения, аутизм и депрессия. Животные, подвергнутые ПС, могут использоваться в качестве моделей психических расстройств. Наш эксперимент проводился с целью исследования особенностей поведенческих отклонений у крыс при воздействии на них ПС, вызванного УЗ переменных частот, и определения возможности создания модели психических расстройств на основе такого воздействия.

Эксперимент был проведен на 9 самках крыс линии Wistar. Самок из экспериментальной группы (n=4) после оплодотворения отсаживали в индивидуальные клетки и помещали под воздействие УЗ переменных частот (20-45 кГц) до родов. Контрольных самок (n=5) содержали в стандартных условиях вивария в индивидуальных клетках без воздействия УЗ. От ПС самок было получено потомство, которое включало 18 самцов (ПС самцы). От контрольных самок было получено 23 самца. В возрасте 2 месяцев проводили тестирование потомства крыс в поведенческих тестах с интервалом 2-3 дня между тестами в следующей последовательности: социальное взаимодействие, трехкамерный тест, открытое поле, распознавание объектов,

В тесте на социальное взаимодействие наблюдалось снижение общего времени социальных контактов у ПС самцов крыс по сравнению с контрольными самцами (p=0.038). Общее время социальных контактов составляло 205±16 сек для контрольных самцов, 151±15 сек для ПС самцов. В тесте открытое поле ПС самцы значительно реже пересекали центр, чем контрольные самцы (p=0.002). Контрольные самцы в среднем пересекали центр 3.0(2.0;5.0) раз, ПС самцы 2.0(0.0;2.0) раз. Также в этом тесте ПС самцы больше замирали по сравнению с контрольными самцами (p=0.044). Общее время замирания для контрольных самцов составляло 0.0(0.0;9.9) сек, для ПС самцов 13.0(0.0;34.6) сек. В параметрах груминга, а также в показателях ветрикальной и горизонтальной активности различий не было. Тест распознавание объекта показал снижение индекса распознавания объектов у ПС самцов (p=0.037). Для контрольных самцов индекс составлял 58.5(31.6;64.4), для ПС самцов 15.2±8.0. Трехкамерный тест проводился в три этапа для определения у потомства уровня предпочтения социальной новизны. Этот тест не показал различия между группами.

Результаты поведенческих тестов показали, что для ПС потомства характерны повышенная тревожность и сниженная когнитивная функция по сравнению с контрольным потомством. Также, ПС уменьшил время социальных контактов, однако не изменил уровень предпочтения социальной новизны у крыс. Согласно научной литературе поведенческие нарушения, которые были показаны у крыс под действием ПС, вызванного действием УЗ, схожи с симптомами депрессии, аутизма и шизофрении. Ранее нами было показано, что депрессивно-подобное поведение не характерно для ПС потомства, поскольку у него не было отмечено изменений в тесте предпочтения сахарозы и в тесте Порсолта, которые являются определяющими для такого поведения. Также, трехкамерный тест является одним из основных поведенческих тестов для грызунов, который указывает у них на поведение сходное с аутизмом у людей. Поскольку в нашем эксперименте данный тест не показал отличий, мы предполагаем, что ПС, вызванный действием УЗ, возможно использовать для создания животной модели шизофрении, а не аутизма. Однако для этого необходимы дополнительные исследования.

UDC 57.024 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-117-118

MODELING PSYCHOPATHOLOGICAL SYNDROMES IN RATS BY PRENATAL STRESS INDUCED BY VARIABLE FREQUENCY ULTRASOUND

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

*Serbsky Federal Medical Research Center for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia
119034, Moscow, Kropotkinskiy In., 23
e-mail: abramova1128@gmail.com*

Prenatal stress (PS) induced by variable frequency ultrasound (US) causes anxious behavior and disturb social and cognitive functions in male rats.

Key words: prenatal stress; models of mental disorders; schizophrenia; ultrasound exposure;

PS negatively affects embryo development and impairs brain functions in offspring. Therefore, maternal stress during pregnancy is a factor in the development of neuropsychiatric disorders in offspring. PS is associated with schizophrenia, autism and depression. Additionally, animals exposed to PS can be used as models of mental disorders. Our experiment was performed to research the features of behavioral deviations in rats under exposure to PS caused by variable frequency US and to determine the possibility of developing a model of mental disorders based on such exposure.

The experiment involved 9 Wistar female rats. The rats from the experimental group ($n = 4$) were kept in individual cages after fertilization and then they were stressed by chronic US impact (20-45 kHz) during the entire pregnancy. The females from the control group ($n = 5$) during pregnancy were kept in normal conditions in individual cages without US impact. PS females gave birth to an offspring that included 18 males (PS males). Control females gave birth to 23 males. The offspring were tested in behavioral tests at the age of two months. The interval between tests was 2-3 days in all groups. The tests were conducted in order: social interaction test, three chamber sociability test, open field, object recognition.

Test for social interaction demonstrated a decrease in the total time of social contacts in PC male rats compared to control males ($p=0.038$). The total time of social contacts was, on average, 205 ± 16 sec for control males and 151 ± 15 sec for PS males. In the open field test, PS males significantly less frequently crossed the center than control males ($p=0.002$). Control males crossed the center $3.0(2.0;5.0)$ times, PS males $2.0(0.0;2.0)$ times on average. In addition, the PS males froze more than the control males ($p=0.044$) in this test. The total freezing time for control males was $0.0(0.0;9.9)$ sec, for PS males it was $13.0(0.0;34.6)$ sec. Grooming parameters as well as vertical and horizontal activity parameters demonstrated no differences. The object recognition test revealed a decrease in the object recognition index for the PS males ($p=0.037$). The index was $58.5(31.6;64.4)$ for the control males and 15.2 ± 8.0 for the PS males. The three chamber sociability test was performed in three stages to determine the level of preference for social novelty in offspring. This test demonstrated no difference between groups.

The results of behavioral tests demonstrated that PS offspring are characterized by increased anxiety and reduced cognitive function in comparison with the control offspring. Additionally, PS has reduced the time of social contact, but has not changed the level of preference for social novelty in rats. According to scientific evidence, the behavioral disorders that were found in rats under the influence of PS caused by US are similar to the symptoms of depression, autism and schizophrenia. We have previously demonstrated that depressive-like behavior is not characteristic of PS offspring, as there were no changes in the sucrose preference test and in the Porsolt test, which are determinant for such behavior. In addition, the three chamber sociability test is one of the main behavioral tests for rodents, which indicates behavior similar to autism in humans. Since this test did not demonstrate any differences in our experiment, we suggest that PS caused by US can be used to design an animal model of schizophrenia rather than autism. However, more research is needed to develop this model.

УДК 57.088 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-119-120

ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ ВИРУСОВ

Ахметова А.И., Яминский И.В.

МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия
119991, Москва, Ленинские горы, дом 1
e-mail: akhmetova@nanoscopy.ru

Зондовая микроскопия позволяет получать уникальные данные о локальных физико-механических свойств вирусов, при этом процедура подготовки в отличие от других методов является простой и не требует дополнительных реагентов. С помощью сканирующей зондовой микроскопии возможно получение высокого разрешения – вплоть до 1 ангстрема.

Ключевые слова: сканирующий зондовый микроскоп, вирус клещевого энцефалита, просвечивающая электронная микроскопия.

С помощью зондовой микроскопии можно определить поверхностную структуру вирусов, вычислить концентрацию частиц в образце, определить, как оседают частицы на подложку, формируют ли пленку или агрегируют. До сих пор только с помощью зондового микроскопа можно получить уникальную информацию о следующих свойствах вирусов: определить механическую жесткость, адгезионные свойства, силу взаимодействия частиц.

Методы просвечивающей микроскопии позволяют получать изображения вирусных частиц в вакууме, что прекрасно дополняет данные, полученные с помощью зондовой микроскопии.

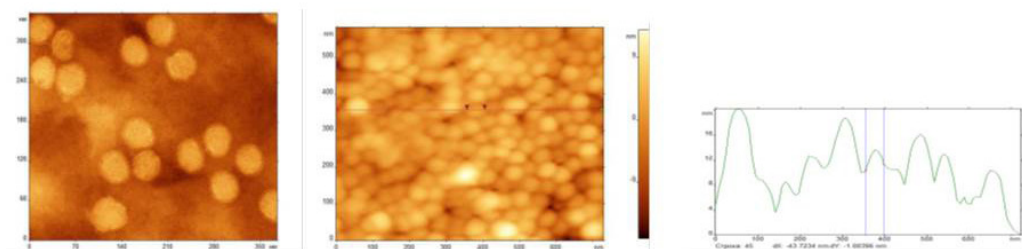


Рисунок 1. Слева – просвечивающая электронная микроскопия, посередине – зондовая микроскопия, справа – сечение образца, по данным сечения диаметр одной вирусной частицы составляет 43 нанометра.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 20-32-90036.

UDC 57.088 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-119-120

PROBE MICROSCOPY IN RESEARCH OF VIRUSES

Akhmetova A.I., Yaminsky I.V.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119991, Moscow, Leninskie gory, building 1
e-mail: akhmetova@nanoscopy.ru

Probe microscopy allows obtaining unique data on the viruses local physic-mechanical properties, while the preparation procedure, unlike other methods, is simple and does not require additional reagents. With the help of scanning probe microscopy, it is possible to obtain high resolution - up to 1 angstrom.

Key words: scanning probe microscope, tick-borne encephalitis virus, transmission electron microscopy.

Probe microscopy can be used to determine the surface structure of viruses, calculate the concentration of particles in a sample, determine how particles settle onto a substrate, and determine whether they form a film or aggregate. Until now, only with the help of a probe microscope it is possible to obtain unique information about the

following properties of viruses: to determine the mechanical rigidity, adhesive properties, and the force of particle interaction.

Transmission microscopy allows images acquisition of viral particles in a vacuum, which perfectly complements the data obtained using probe microscopy.

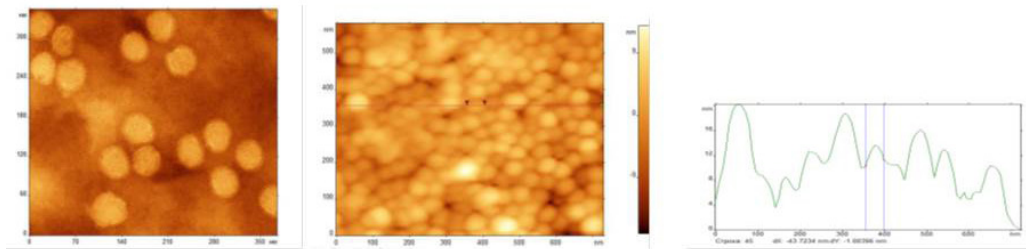


Figure 1. On the left - transmission electron microscopy, in the middle - probe microscopy, on the right - sample cross-section; according to the cross-sectional data, the diameter of one virus particle is 43 nanometers.

The research was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research, project No. 20-32-90036.

УДК 57.088 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-120-122

ОБНАРУЖЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ

Ахметова А.И., Яминский И.В.

МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия
 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1
 Центр перспективных технологий
 119311, Москва, ул. Строителей, 4-5-47
 e-mail: akhmetova@nanoscopy.ru

Электромеханические биосенсоры позволяют детектировать вирусы с высокой чувствительностью – до единичных вирусных частиц. В настоящей работе для обнаружения биологических агентов применены электромеханические системы на основе кантилеверных биочипов.

Ключевые слова: биосенсор, сканирующий зондовый микроскоп, пьезокерамика, механический резонанс.

Биочип состоит из двух пьезоэлементных дисков, по бокам которых припаяны электроды. Можно подавать сигнал как на первый, так и на второй контакт, поэтому приемная сторона - любая. Сигнал на приёмной стороне не сдвигается по частоте относительно частоты, задаваемой синтезатором. Меняется только амплитуда и фаза сигнала из-за того, что меняется электрическое сопротивление биочипа в резонансе и антирезонансе. Все измерения резонансной частоты были получены при электрическом поле в пьезокерамике в диапазоне от 340 - 500 В/м. Подаваемое напряжение на пьезокерамику составляет 34-50 мВ.

В работе определяется сдвиг резонансной частоты за счет изменения массы при прикреплении мишени к пьезоэлементу. Для этого сначала необходимо найти резонансную частоту (то есть найти диапазон частот, в которых она располагается). В этом диапазоне частот надо подать сигнал с постоянной амплитудой (время пробега всего диапазона для примера 1 секунда). После пробега всего диапазона получаем 1 резонансный пик. Затем снова проходим этот диапазон и так получаем N резонансных пиков, которые обрабатываем в дальнейшем (ищем «центр масс») и строим зависимость изменения частоты резонансного пика от времени. Обработкой этих данных занимается ПО ФемтоСкан Онлайн [1].

Для определения резонансной частоты колебаний кантилевера диаметром l мы используем формулу для пьезокерамического диска [2]

$$f = \frac{n}{2l} \sqrt{\frac{Y}{\rho}}$$

$Y = 0,7 \times 10^{11}$ – модуль Юнга для ЦТС 19, $\rho = 7,5 \times 10^3$ – плотность для ЦТС 19, n – номер гармоники.

Для диска диаметром 3 мм резонансный пик должен быть на частоте 510 кГц. Для проверки полу-

ченных данных собираем установку на основе электронной схемы зондового микроскопа. В дальнейшем будет разработана электронная схема для управления биосенсором, включающая платы цифрового синтезатора частот, прецизионного усилителя входного сигнала, интерфейса, ЦАП-АЦП, стабилизированного питания. Ниже представлены результаты определения резонансного пика для диска диаметром 3 мм.

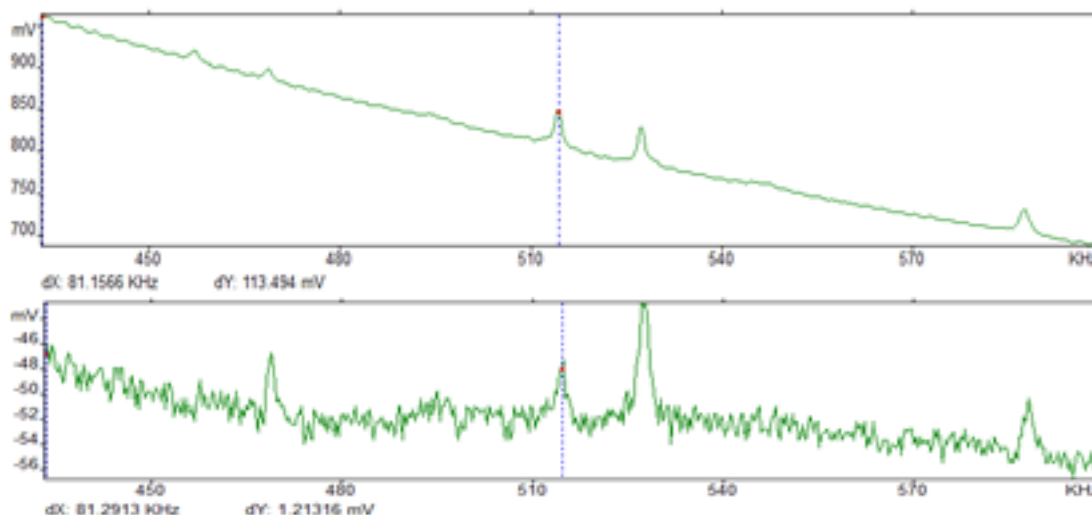


Рисунок 1. Полученные кривые по определению резонансного пика: верхний график амплитуда колебаний, нижний график – фаза

Подтверждено, что наибольший вклад в изменение резонансной частоты вносит именно изменение жесткости пленки на поверхности биочипа, а не прикрепленная масса.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 20-32-90036

Литература

1. Ахметова А. И., Яминский И. В. Программное обеспечение ФемтоСкан Онлайн в решении задач биологии и медицины // Медицина и высокие технологии. – 2019. – № 1. – С. 16–22.
2. Е.А.Фрид, С.Х.Азарх. Пьезокерамические фильтры. М.: Энергия, 1967. – с. 40.

UDC 57.088 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-120-122

DETECTION OF BIOLOGICAL AGENTS USING ELECTROMECHANICAL BIOSENSORS

Akhmetova A.I., Yaminsky I.V.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119991, Moscow, Leninskie gory, building 1
Center for Advanced Technologies
119311, Moscow, st. Builders, 4-5-47
e-mail: akhmetova@nanoscopy.ru

Electromechanical biosensors allow detecting viruses with high sensitivity – up to single viral particles. In this work, electromechanical systems based on cantilever biochips are used to detect biological agents.

Key words: biosensor, scanning probe microscope, piezoceramics, mechanical resonance.

The biochip consists of two piezoelectric disks, on the sides of which electrodes are soldered. A signal can be applied to both the first and the second contact, so the receiving side is any. The signal on the receiving side is not frequency shifted relative to the frequency set by the synthesizer. Only the amplitude and phase of the signal change due to the change in the electrical resistance of the biochip in resonance and antiresonance. All measurements of the

resonant frequency were obtained with an electric field in piezoelectric ceramics in the range from 340 - 500 V/m. The applied voltage to the piezoceramic is 34-50 mV.

The work determines the shift of the resonance frequency due to the change in mass when the target is attached to the piezoelectric element. To do this, you first need to find the resonant frequency (that is, find the frequency range in which it is located). In this frequency range, a signal with a constant amplitude must be applied (the travel time of the entire range, for example, is 1 second). After running the entire range, we get 1 resonance peak. Then we go through this range again and so we get N resonance peaks, which we process in the future (we are looking for the "center of mass") and build the dependence of the change in the frequency of the resonance peak on time. This data is processed by FemtoScan Online software [1]. To determine the resonant vibration frequency of the cantilever with a diameter l, we use the formula for a piezoceramic disk [2]:

$$f = \frac{n}{2l} \sqrt{\frac{Y}{\rho}}$$

$Y = 0.7 \times 10^{11}$ - Young's modulus for PZT 19,

$\rho = 7.5 \times 10^3$ - density for PZT 19, n - harmonic number.

For a 3 mm disc, the resonance peak should be at 510 kHz. To check the data obtained, we assemble the installation based on the electronic circuit of the probe microscope. In the future, an electronic circuit will be developed for controlling the biosensor, including boards for a digital frequency synthesizer, a precision amplifier for an input signal, an interface, a DAC-ADC, and a stabilized power supply. Below are the results of determining the resonance peak for a disk with a diameter of 3 mm.

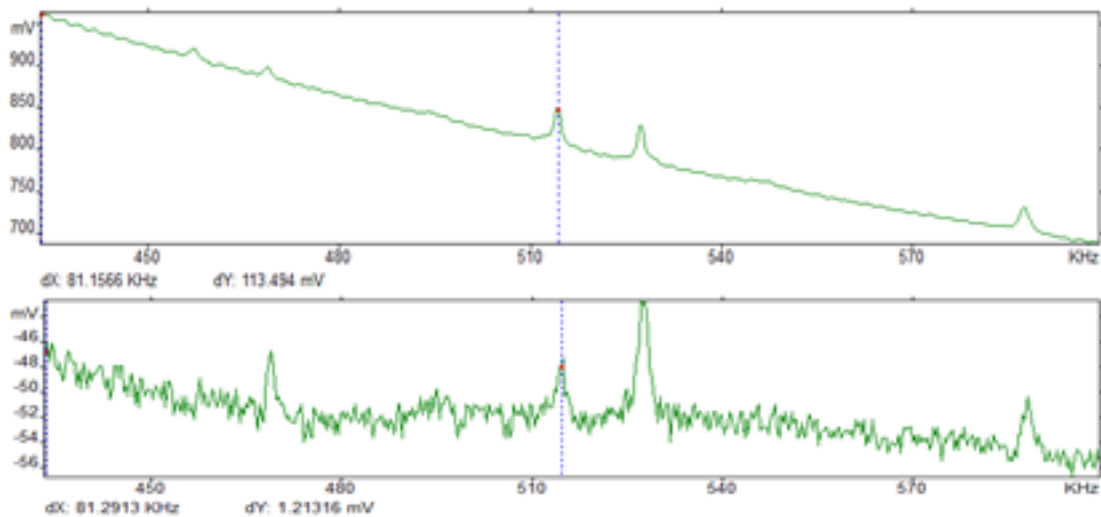


Figure 1. Obtained curves for determining the resonance peak:
 the upper graph is the vibration amplitude, the lower graph is the phase

It was confirmed that it is the change in the film rigidity on the biochip surface, and not the attached mass, that makes the greatest contribution to the change in the resonance frequency.

The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research, project No. 20-32-90036

References

1. Akhmetova A.I., Yaminsky I.V. FemtoScan Online software in solving problems of biology and medicine // *Medicine and high technologies*. 2019. № 1. pp 16-22.
2. E.A.Fried, S.H. Azarch. *Piezoceramic filters*. M.: Energiya, 1967. p. 40.

543.553.8 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-123-124

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ ПРОТИВОРАКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ

Ванеев А.Н., Тимошенко Р.В., Колмогоров В.С., Чмелюк Н.С., Ямансаров Э.Ю., Петров Р.А., Ерофеев А.С., Горелкин П.В., Корчев Ю.Е., Мажуга А.Г., Клячко Н.Л.

Химический факультет Московского Государственного Университета имени М.В.

Ломоносова, Москва, Россия

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва, Россия.

119049, Москва, Ленинский проспект, 4

e-mail: vaneev.aleksandr@gmail.com

В данной работе оценивали действие новых синтезированных противораковых конъюгатов на клеточные линии HepG2 и PC-3 посредством определения АФК внутри единичных клеток с помощью электрохимического метода.

Ключевые слова: активные формы кислорода, противораковая терапия, адресная доставка лекарств

Активные формы кислорода (АФК) связаны с индукцией апоптоза. Изучение внутриклеточных уровней АФК может представлять одну из возможностей оценки воздействия лекарств на раковые клетки. АФК, высвобождаемые из клеток во время апоптоза, играют решающую роль в развитии рака и нейро-дегенеративных заболеваний. В настоящее время стоит задача разработки методов лечения раковых опухолей, и оперативная оценка эффективности противоопухолевых препаратов является приоритетной задачей. В настоящее время все большее внимание уделяется определению АФК с помощью наносенсоров в отдельных клетках. Однако традиционные флуоресцентные красители имеют ряд недостатков. Эти красители, как известно, по своей природе цитотоксичны и, таким образом, могут значительно изменять клеточный метаболизм.

В данной работе мы разработали электрохимический метод определения АФК внутри клеток. С помощью этого метода можно оценить действие новых разработанных препаратов на клетки. Мы оценили влияние конъюгатов доцетаксела со специфичным вектором к асиалогликопротеиновому рецептору (ASGP-R) на линии раковых клеток с (HepG2) и без (PC-3) ASGP-R. Наши данные, полученные с использованием платиновых наноэлектродов показали увеличение АФК при использовании конъюгатов по сравнению с доцетакселом. В будущем этот метод может позволить оценить действие лекарств *in vitro* и помочь в до-клинических испытаниях препаратов.

Исследование поддержано Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках Программы повышения конкурентоспособности НИТУ «МИСиС», реализуемой постановлением Правительства от 16 марта 2013 г. № 211, темой с гос регистрацией AAAA-A16-116052010081-5 и Программой развития МГУ.

543.553.8 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-123-124

TESTING THE EFFICACY OF NEW ANTICANCER CONJUGATES FOR THE TARGETED DELIVERY

Vaneev A.N., Timoshenko R.V., Kolmogorov V.S., Chmelyuk N.S., Yamansarov E.Y., Petrov R.A., Erofeev A.S., Gorelkin P.V., Korchev Y. E., Majouga A.G., Klyachko N.L.

Lomonosov Moscow State University, School of Chemistry, Moscow, Russia

119991, Moscow, GSP-1, 1-3 Leninskiye Gory

National University of Science and Technology "MISIS", Moscow, Russia

119049, Moscow, Leninsky prospect 4

e-mail: vaneev.aleksandr@gmail.com

In this work, the effect of the new synthesized anticancer conjugates on the HepG2 and PC-3 cell lines was evaluated by determining ROS inside single cells using an electrochemical method.

Key words: nanoparticles, anticancer therapy, drug delivery

Reactive oxygen species (ROS) is associated with induction of apoptosis. The study of intracellular ROS levels may represent one possibility to research the effects of drugs in cancer cells. ROS that released from cells during apoptosis play a crucial role in the development of cancer and neurodegenerative diseases. Nowadays, there is the problem of developing methods for treating cancer tumors, thus, quick evaluation of the anticancer drugs efficiency is the priority. The ROS determination using nanosensors in single cells has gained increasing attention. However, traditional fluorescent dyes have a number of disadvantages. These dyes are known to be intrinsically cytotoxic and thus can significantly alter cellular metabolism.

Here, we have developed an electrochemical method for determining the ROS inside the cells. Using this method, it is possible to evaluate the effect of the developed drugs on the cells. We evaluated the effect of ASGP-R (Asialoglycoprotein receptor) - specific carrier equipped by docetaxel on cancer cell lines with (HepG2) and without (PC-3) ASGP receptors. Our data obtained by using carbon-filled quartz nanopipettes with platinum tips showed a ROS increase using conjugates compared with native drugs. In the future, this method may allow evaluating the effect of drugs *in vitro* and to help validate drug candidates for preclinical evaluation.

The research was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation in the framework of increase Competitiveness Program of NUST "MISIS", implemented by a governmental decree dated March 16, 2013, No. 211, State Topic AAAA-A16-116052010081-5, MSU Program of Development.

УДК: 620.3, ББК: 28.087 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-124-126

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ В ОНКОЛОГИИ

Д.Г.Веденяпина¹, А.С.Сёмкина², М.А.Абакумов², В.П.Чехонин², П.В.Островерхов¹, М.А.Грин¹

¹ РТУ МИРЭА, Россия, 119571, Москва, Проспект Вернадского, 86, т.ел.: 89998566431, e-mail: lykrecia@mail.ru, mrp_ost@mail.ru, michael_grin@mail.ru²

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1, e-mail: alevtina.semkina@gmail.com, abakumov_ma@rsmu.ru, chekhoninnew@yandex.ru

В данной работе был получен комплекс МНЧ-ЧСА-ПЭГ-ФС, изучены его физико-химические свойства. Также были проведены биологические исследования. А именно, была исследована способность препарата накапливаться в опухолевых клетках СТ26 *in vitro* и кинетика накопления препарата в опухоли *in vivo*. Затем было проведено изучение эффективности фотодинамической терапии при разных условиях. Максимальный терапевтический эффект был достигнут при облучении через час после введение препарата.

Ключевые слова: МНЧ, ФС, МРТ, IVIS, ФДТ, доставка лекарств

Был получен наноструктурированный фотосенсибилизатор (МНЧ-ЧСА-ПЭГ-ФС) на основе аминоамида метилового эфира бakteорифеофорбида (ФС) и магнитных наночастиц, покрытых человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) и полиэтиленгликолем (ПЭГ). Были проведены исследования физико-химических свойств полученного комплекса, включая спектральные свойства, размеры частиц, форма, устойчивость в различных средах и времени и элементный состав. Для этого использовали следующие методы: спектрофотометрию и спектрофлуориметрию, метод динамического рассеяния света (ДРС), просвечивающую электронную микроскопию (ПЭМ) и атомно-эмиссионная спектроскопия АЭС.

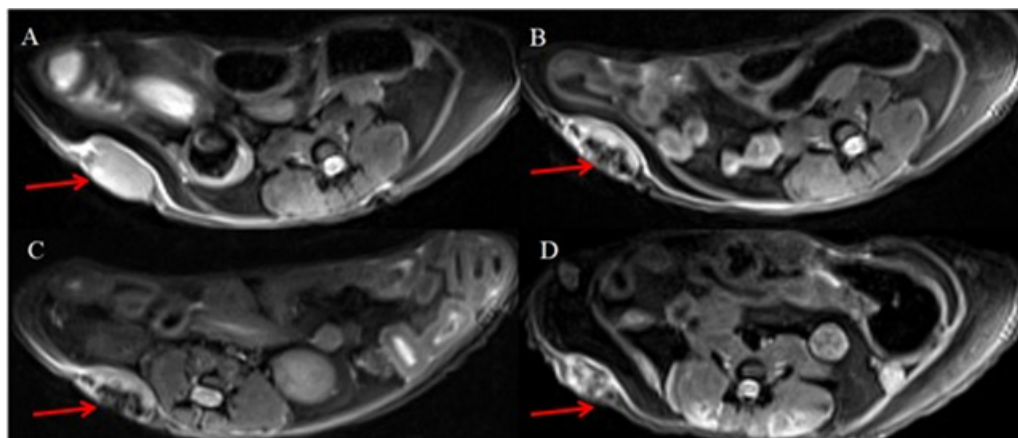
Затем были выполнены биологические испытания *in vitro* и *in vivo*:

1) В ходе биологических испытаний *in vitro* при помощи конфокальной микроскопии было показано накопление в опухолевых клетках линии СТ26, а также фотоиндуцированная цитотоксичность МНЧ-ЧСА-ПЭГ-ФС@4 при помощи МТТ-теста.

2) Для исследования биораспределения и кинетики накопления МНЧ-ЧСА-ПЭГ-ФС@4 *in vivo* применялись методы флуоресцентной визуализации IVIS и магнитно-резонансной томографии. Было продемонстрировано, что все использованные методы дают схожие результаты по биораспределению препарата, а также время максимального накопления препарата в опухоли составило 1 час после внутривенного введения.

3) Исследование фотодинамической активности препарата *in vivo* подтвердило данные кинетики накопления препарата в опухоли: наиболее эффективное торможение роста опухолей наблюдали при облу-

чении через 1 час после введения МНЧ-ЧСА-ПЭГ-ФС@4. Были выявлены оптимальные для терапии параметры: использованная доза препарата - 5 мг/кг, время между инъекцией и облучением - 1 час, мощность лазера – 90 Дж/см².



1) Синтезирован комплекс МНЧ-ЧСА-ПЭГ-ФС@4 и изучены его физико-химические свойства 2) Изучена способность МНЧ-ЧСА-ПЭГ-ФС@4 накапливаться в опухолевых клетках *in vitro* 3) Изучено биораспределение комплекса *in vivo* различными методами, доказана возможность определять максимум накопления препарата с помощью МРТ Таким образом стало возможным отслеживать накопление препарата в опухоли при помощи МРТ, не прибегая к оптическим методам, имеющим ряд ограничений.

Финансирование: Грант РФФИ № 16-33-60180 Гибридные материалы на основе наночастиц оксида железа и производных природных бактериохлорофиллов

Литература

1. П.В. Островерхов, А.С. Семкина В.А. Науменко Е.А. Плотнокова П.А. Мельников Т.О. Абакумова, Р.И. Якубовская, А.Ф. Миронов, С.С. Водопьянов, А.М. Абакумов, А.Г. Мажуга, М.А. Грин, В.П. Чехонин, М.А. Абакумов. Синтез и характеристика нагруженных бактериохлорином магнитных наночастиц (МНЧ) для персонализированной МРТ-контролируемой доставки фотосенсибилизаторов к опухоли // *Journal of Colloid and Interface Science*. 2019. Том. 537. 132–141.
2. П. Островерхов, А. Семкина, А. Никитин, А. Смирнов, Д. Веденяпина, К. Власова, И. Киреев, М. Грин, В. Чехонин, А. Мажуга, М. Абакумов. Человеческий сывороточный альбумин как эффективное покрытие для гидрофобных фотосенсибилизаторов для иммобилизации на магнитных наночастицах // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2019. Том 475. 108 - 114.
3. Моквена М.Г. ; Крюгер, С.А. ; Иван, М.Т. ; Хайди, А. Обзор систем доставки лекарственных средств наноструктурированных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии рака легких. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2018, 22, 147–154.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-124-126

DEVELOPMENT OF A PHOTSENSITIZER DELIVERY SYSTEM FOR THERAPY AND DIAGNOSTICS IN ONCOLOGY

D.Vedeniapina¹, A.Semkina², M.Abakumov², V.Chekxonin², P.Ostroverkhov¹, M.Grin¹

¹ RTU MIREA, Russia, 119571, Moscow, Vernadsky Avenue, 86

² Pirogov Russian National Research Medical University, Russia, 117997, Moscow, Ostrovitianov Street, 1

In this work, the MNP-HSA-PEG-PS@4 complex was obtained and its physicochemical properties were studied. Biological studies have also been conducted. Namely, the ability of the drug to accumulate in CT26 tumor cells *in vitro* and the kinetics of drug accumulation in the tumor *in vivo* were studied. Then, the effectiveness of photodynamic therapy was studied under different conditions. The maximum therapeutic effect was achieved with irradiation at 1 hour after injection of the drug.

Key words: MNP, PS, MRI, IVIS, PDT, drug delivery

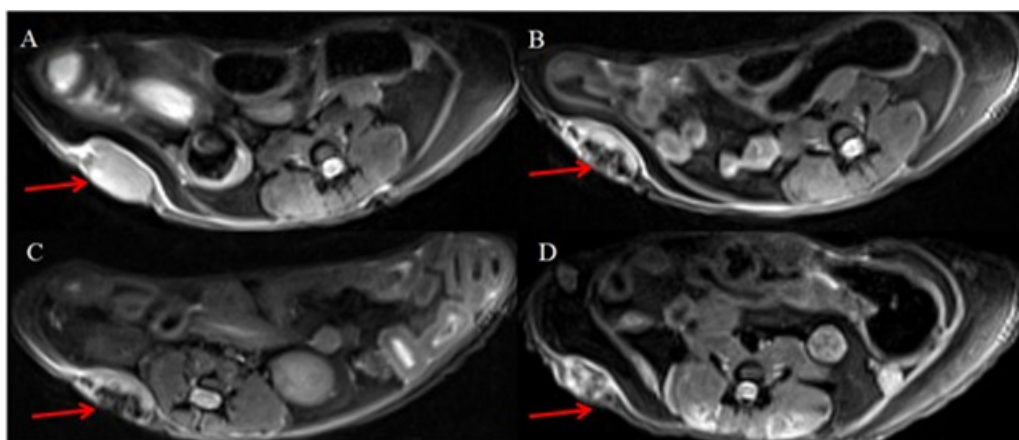
A nanostructured photosensitizer (MNP-HSA-PEG-PS@4) based on aminoamide of methyl ester of bacteriopheoforbide (PS) and magnetic nanoparticles coated with human serum albumin (HSA) and polyethylene glycol (PEG) was obtained. The physicochemical properties of the resulting complex were investigated, including spectral properties, particle sizes, shape, stability in various media and time, and elemental composition. For this, the following methods were used: spectrophotometry and spectrofluorimetry, dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy (TEM) and atomic emission spectroscopy (AES).

Then, *in vitro* and *in vivo* biological tests were performed:

1) *In vitro* biological tests using confocal microscopy showed the accumulation of MNP-HAS-PEG-PS@4 in tumor cells CT26 line, as well as its photoinduced cytotoxicity using the MTT test.

2) We used methods of fluorescence imaging IVIS and magnetic resonance imaging to study the biodistribution and kinetics of the accumulation of MNP-HSA-PEG-PS@4 *in vivo*. It was demonstrated that all the methods used give similar results for the biodistribution of the drug, and the maximum accumulation of the drug in the tumor was at 1 hour after intravenous administration.

3) An *in vivo* study of the photodynamic activity of the drug confirmed the kinetics of drug accumulation in the tumor: the most effective inhibition of tumor growth was observed upon irradiation at 1 hour after the injection of MNP-HSA-PEG-PS@4. The optimal parameters for therapy were identified: the used dose of the drug was 5 mg / kg, the time between injection and irradiation was 1 hour, and the laser power was 90 J / cm².



1) MNP-HSA-PEG-PS@4 complex was synthesized and its physicochemical properties were investigated 2) The ability of MNP-HSA-PEG-PS@4 to accumulate in tumor cells *in vitro* was studied 3) The biodistribution of the complex *in vivo* was studied by various methods, the ability to determine the maximum accumulation of the drug using MRI was proved Thus, it became possible to track the accumulation of the drug in a tumor using MRI, without resorting to optical methods, which have several limitations.

Grant: RFBR grant No. 16-33-60180 Hybrid materials based on iron oxide nanoparticles and derivatives of natural bacteriochlorophylls.

References

1. P.V. Ostroverkhov, A.S. Semkina, V.A. Naumenko, E.A. Plotnikova, P.A. Melnikov, T.O. Abakumova, R.I. Yakubovskaya, A.F. Mironov, S.S. Vodopyanov, A.M. Abakumov, A.G. Majouga, M.A. Grin, V.P. Chekhonin, M.A. Abakumov. Synthesis and characterization of bacteriochlorin loaded magnetic nanoparticles (MNP) for personalized MRI guided photosensitizers delivery to tumor // *Journal of Colloid and Interface Science*. 2019. Vol. 537. 132–141.
2. P. Ostroverkhov, A. Semkina, A. Nikitin, A. Smirnov, D. Vedenyapina, K. Vlasova, I.Kireev, M. Grin, V. Chekhonin, A. Majouga, M. Abakumov. Human serum albumin as an effective coating for hydrophobic photosensitizes immobilization on magnetic nanoparticles // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2019. Vol.475. 108 - 114.
3. Mokwena, M.G.; Kruger, C.A.; Ivan, M.T.; Heidi, A. A review of nanoparticle photosensitizer drug delivery uptake systems for photodynamic treatment of lung cancer. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2018, 22, 147–154.

УДК 606:615.456 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-127-129

РОЛЬ НЕЙТРОФИЛОВ В ДОСТАВКЕ НАНОЧАСТИЦ В ОПУХОЛЬ

Вишнеvский Д.А., Науменко В.А., Чехонин В.П.

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

Описаны нейтрофил-ассоциированные механизмы накопления липосомальных и магнитных наночастиц в тканях опухоли. Методом интравитальной микроскопии показан перенос магнитных наночастиц захватившими их в кровотоке нейтрофилами, а для липосом - накопление наночастиц в тканях опухоли за счет утечек, возникающих в местах экстравазации нейтрофилов.

Ключевые слова: нейтрофилы; онкология; наночастицы; адресная доставка; интравитальная микроскопия.

Липосомы и магнитные наночастицы (МНЧ) - одни из самых распространенных и широко используемых наночастиц (НЧ) в терапии и диагностики опухолевых заболеваний. Однако, несмотря на преимущества НЧ по сравнению с свободным лекарственным веществом, с использованием НЧ связан ряд трудностей [1]. Так, введенные внутривенно НЧ поглощаются клетками мононуклеарно-фагоцитарной системы, накапливаются в печени, почках, селезенке и других органах. Это не только приводит к возникновению дополнительных побочных эффектов, но и к снижению количества НЧ, попадающих в ткань опухоли [2]. Кроме того, для различных типов опухолей показано, что накопление НЧ происходит за счет дополнительного вклада различных механизмов активного переноса (транцитоз эндотелиоцитами, перенос экстравазирующими клетками) [3], а не только пассивного выхода НЧ из кровотока в ткани, основанного на EPR-эффекте (англ. Enhanced Permeability and Retention - усиленное накопление и задержание) [4]. В связи с этим для разработки систем доставки лекарственных средств на основе НЧ требуется более детальная и комплексная оценка не только процессов и механизмов накопления наночастиц в тканях опухоли, но и их распределения в организме. Метод интравитальной микроскопии (ИВМ) позволяет изучать такие процессы в реальном времени в условиях максимально близких к тем, которые происходят в организме в интактном состоянии [5].

В данной работе с помощью ИВМ были описаны механизмы накопления флуоресцентно-меченых липосом и МНЧ (кубов и кластеров) на различных опухолевых моделях. Для липосом на моделях опухолей рака молочной железы мыши (4T1), меланомы (B16) и рака простаты человека (22Rv1), а также в здоровых тканях кожи были описаны два типа накопления НЧ, ассоциированных с нейтрофилами. Для липосом было показано, что они не захватываются нейтрофилами в кровотоке, однако, экстравазирующий в ткани нейтрофил способствует возникновению локального периваскулярного накопления НЧ - микроутечек. Такой тип накопления наблюдался как в опухолевых тканях, так и в здоровых. В этом случае НЧ остаются вблизи сосуда и не распространяются глубже в ткани. Второй тип накопления НЧ - макроутечка, выражалась возникновением диффузного распространения НЧ в ткани, тем самым обеспечивая накопление НЧ в опухоли. Макроутечки возникали при экстравазации нейтрофилов, когда гранулоцит покидал сосуд через места с ранее аккумулированными НЧ в виде микроутечек. В свою очередь для МНЧ на моделях опухолей рака молочной железы мыши (4T1) и рака прямой кишки (CT26) был показан совершенно другой механизм накопления НЧ. МНЧ, в отличие от липосом, захватывались нейтрофилами периферической крови. Движение загруженных НЧ нейтрофилов из сосуда в опухоль обеспечивало накопление НЧ в тканях. Кроме того, для липосом и МНЧ степень накопления препарата в тканях опухоли зависела от ее типа. Для опухолей, характеризующихся увеличением количества нейтрофилов в периферической крови (4T1) наблюдалось лучшее накопление НЧ. Это также было подтверждено тем, что деплегия нейтрофилов приводит к значительному снижению накопления НЧ.

Изучение поведения различных типов НЧ показало, что степень и механизмы их накопления зависят не только от типа НЧ, но и от типа опухоли. Таким образом, комплексная оценка совокупности этих параметров может помочь в разработке систем доставки лекарственных препаратов, учитывающих особенности конкретного опухолевого заболевания, для повышения эффективности терапии [6].

Литература

1. Hare J. I., Lammers T., Ashford M. B., Puri S., Storm G., Barry S. T. Challenges and strategies in anti-cancer

- nanomedicine development: An industry perspective. Adv. Drug Deliv. Rev. Jan. 2017. V. 108. P. 25–38.*
2. Wilhelm S. et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat. Rev. Mater.* May 2016. V. 1. №. 5. P. 16014.
 3. Sindhwani S. et al. The entry of nanoparticles into solid tumours. *Nat. Mater.* May 2020. V. 19. №. 5. P. 566–575.
 4. Danhier F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J. Control. Release.* Dec. 2016. V. 244. P. 108–121.
 5. Miller M. A. and Weissleder R. Imaging the pharmacology of nanomaterials by intravital microscopy: Toward understanding their biological behavior. *Adv. Drug Deliv. Rev.* Apr. 2017. V. 113. P. 61–86.
 6. Jahan S. T., Sadat S. M. A., Walliser M., Haddadi A. Targeted Therapeutic Nanoparticles: An Immense Promise to Fight against Cancer. *J. Drug Deliv.* 2017. V. 2017. P. 1–24.

UDC 606:615.456 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-127-129

ROLE OF NEUTROPHILS IN THE DELIVERY OF NANOPARTICLE INTO THE TUMOR

Vishnevskiy D.A., Naumenko V.A., Chekhonin V.P.

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

Mechanisms of liposomes and magnetic nanoparticles accumulation in the tumor tissue were shown to be associated with neutrophils. The intravital microscopy allowed to visualize the transfer of magnetic nanoparticles by neutrophils that captured these nanoparticles, while liposomes accumulate in the tissue via micro- and macroleakages appearing at sites of neutrophil extravasation.

Key words: neutrophils; oncology; nanoparticles; target delivery; intravital microscopy.

Liposomes and magnetic nanoparticles (MNPs) are the most spread and widely used nanoparticles (NPs) in the therapy and diagnostics of tumors. However, advantages of NPs over free drugs are associated with a number of obstacles [1]. NPs are captured by cells of the mononuclear-phagocyte system in the bloodstream, they accumulate in the liver, spleen, kidneys and other tissues. This behavior results in the appearance of additional side effects, as well as reduction of NPs accumulation in the tumor tissue [2]. Despite that, for different tumor types the accumulation of NPs in tumor tissues is shown to be dependent not only on passive delivery, based on the EPR-effect (Enhanced Permeability and Retention) [3], but also on the additional active transport, such as the transcytosis by endotheliocytes and NPs transfer by extravasating cells [4]. The precise and complex study of processes and mechanisms of NPs accumulation in tumor tissues, as well as distribution of NPs in the whole body is the necessary step in the development of drug delivery systems in regard to observation mentioned above. The intravital microscopy (IVM) allows to study such processes in real time in conditions that are closely identical to those in the intact organism [5].

In this work accumulation mechanisms of fluorescently-labeled liposomes and MNPs (cubes and clusters) in tumor tissue were studied by IVM in different tumor types. Liposomes demonstrated two distinct neutrophil-associated mechanisms of accumulation in tumor types of mouse mammary cancer (4t1), melanoma (B16) and human prostate cancer (22Rv1), as well as in healthy skin tissues. It was shown that neutrophils do not uptake liposomes in the bloodstream, but rather facilitate local perivascular accumulation of liposomes at the sites of neutrophil extravasation, described as microleakages. In this case NPs stay in the proximity of blood vessel and does not penetrate deeper into the tissues. The second type of liposomes accumulation was described as macroleakages, that are observed as the NPs diffusion into tissues. Macroleakages were also associated with extravasating neutrophils, when granulocyte leaves the blood vessel at sites with previously accumulated NPs via microleakage. On the other hand, the MNPs accumulation in tumor models of mouse mammary cancer (4t1) and colon cancer (CT26) had the entirely different mechanism. MNPs in contrast to liposomes were captured by intravascular neutrophils in the bloodstream. The NPs-laden neutrophil migration from the blood vessel into the tumor facilitated NPs accumulation in tissues. Additionally, from liposomes and MNPs the degree of NPs accumulation in tumor tissues depends on the tumor type, as it was shown that tumors characterized by high neutrophil number (4T1) in the bloodstream better accumulate NPs. Also, this was confirmed by the decrease of NPs accumulation in the 4T1 tumor when neutrophils were systemically depleted.

The study of different types of NPs demonstrated that the degree and mechanisms of NPs accumulation depend not only on NP itself, but also on the tumor type. The complex evaluation of these characteristics will help to develop drug delivery systems in regard to particular properties of certain tumor types to increase effectiveness of the therapy [6].

References

1. Hare J. I., Lammers T., Ashford M. B., Puri S., Storm G., Barry S. T. Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* Jan. 2017. V. 108. P. 25–38.
2. Wilhelm S. et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat. Rev. Mater.* May 2016. V. 1. №. 5. P. 16014.
3. Danhier F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J. Control. Release.* Dec. 2016. V. 244. P. 108–121.
4. Sindhvani S. et al. The entry of nanoparticles into solid tumours. *Nat. Mater.* May 2020. V. 19. №. 5. P. 566–575.
5. Miller M. A. and Weissleder R. Imaging the pharmacology of nanomaterials by intravital microscopy: Toward understanding their biological behavior. *Adv. Drug Deliv. Rev.* Apr. 2017. V. 113. P. 61–86.
6. Jahan S. T., Sadat S. M. A., Walliser M., Haddadi A. Targeted Therapeutic Nanoparticles: An Immense Promise to Fight against Cancer. *J. Drug Deliv.* 2017. V. 2017. P. 1–24.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-129-130

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ В ТЕРАПИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ КИСТ СПИННОГО МОЗГА

Воронова А.Д., Степанова О.В., Чадин А.В., Фурса Г.А., Карсунцева Е.К., Валихов М.П., Семкина А.С., Решетов И.В., Чехонин В.П.

ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» МЗ РФ, Москва, Россия
119034, г. Москва, Кропоткинский пер., д. 23
e-mail: nastyanastyav@mail.ru

Были получены обкладочные клетки и нейральные стволовые/прогениторные клетки из обонятельной выстилки крыс. Проведена сравнительная оценка эффективности этих клеток при посттравматических кистах спинного мозга с помощью анализа размеров кист и динамики восстановления двигательной активности задних конечностей крыс.

Ключевые слова: клеточная терапия; обонятельная выстилка; обкладочные клетки; нейральные стволовые/прогениторные клетки; посттравматические кисты спинного мозга.

Лечение посттравматических кист спинного является актуальной проблемой биомедицины. Хирургические и медикаментозные методы не приводят к восстановлению нервной ткани после повреждения. В связи с этим перспективным направлением в этой области является клеточная терапия. Оптимальным источником для получения клеток для трансплантации в спинной мозг рассматривается обонятельная выстилка. Она является частью периферической нервной системы и содержит обкладочные клетки и нейральные стволовые/прогениторные клетки (НСПК), эффективность которых была показана в ряде экспериментальных исследований по лечению травм спинного мозга. Однако эффективность применения клеток обонятельной выстилки в терапии посттравматических кист спинного мозга не достаточно изучена.

В данной работе была проведена сравнительная оценка эффективности применения обкладочных клеток, НСПК и комбинации обкладочных клеток и НСПК при посттравматических кистах спинного мозга. Для этого обкладочные клетки и НСПК были получены по разработанным нами протоколам (1,2) из обонятельной выстилки крыс (n=30). Посттравматические кисты были смоделированы по модифицированной методике Zhang C. (2015) (3). Обкладочные клетки в количестве 750 тысяч (n=8), НСПК в количестве 200 тысяч (n=5) и комбинацию обкладочных и НСПК (750 тысяч и 200 тысяч клеток соответственно) (n=3) трансплантировали в область кист через 4 недели после травмы. Контрольной группе вводили среду без клеток (n=9). До и после трансплантации был проведен анализ размеров кист по данным МРТ и оценка динамики восстановления двигательной активности задних конечностей крыс по шкале BBB.

Показано, что достоверное (p<0,05) улучшение двигательной активности и уменьшение размеров кист наблюдается только при трансплантации обкладочных клеток. Таким образом препарат обкладочных клеток может быть рекомендован для дальнейших исследований в области терапии посттравматических кист спинного мозга.

Работа выполнена при поддержке РФФ: грант № 17-15-01133.

Литература

1. Stepanova O.V., Voronova A.D., Chadin A.V., Valikhov M.P., Abakumov M.A., Reshetov I.V., Chekhonin V.P. Isolation of Rat Olfactory Ensheathing Cells and Their Use in the Therapy of Posttraumatic Cysts of the Spinal Cord // *Bull Exp Biol Med.* – 2018. – V. 165. – No 1. – P. 132-5.

2. Voronova A.D., Stepanova O.V., Valikhov M.P., Chadin A.V., Semkina A.S., Chekhonin V.P. Neural Stem/Progenitor Cells of Human Olfactory Mucosa for the Treatment of Chronic Spinal Cord Injuries // *Bull Exp Biol Med.* – 2020. – V. 168. – No 4. – P. 538-41.
3. Zhang C. Precise Delivery Into Chronic Spinal Cord Injury Syringomyelic Cysts with Magnetic Nanoparticles MRI Visualization // *Med Sci Monit.* – 2015. – V. 21. – P. 3179-85.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-129-130

COMPARISON OF THE EFFICIENCY OF OLFACTORY MUCOSA CELLS IN THERAPY OF POSTTRAUMATIC SPINAL CINDERS

Voronova A.D., Stepanova O.V., Chadin A.V., Fursa G.A., Karsuntseva E.K., Valikhov M.P., Semkina A.S., Reshetov I.V., Chekhonin V.P.

The Serbsky State Scientific Center for Social and Forensic Psychiatry, Moscow, Russia
 119034, Moscow, Kropotkinskiy per., 23
 e-mail: nastyanastyav@mail.ru

Were obtained olfactory ensheathing cells and neural stem/progenitor cells from the olfactory mucosa of rats. A comparative assessment of the effectiveness of these cells in posttraumatic cysts of the spinal cord was carried out using the analysis of the size of the cysts and the dynamics of restoration of the motor activity of the hind limbs of rats.

Key words: cell therapy; olfactory mucosa; olfactory ensheathing cells; neural stem/progenitor cells; post-traumatic cysts of the spinal cord.

Treatment of post-traumatic spinal cysts is an urgent problem in biomedicine. Surgical and medical methods do not lead to the restoration of nerve tissue after damage. In this regard, cell therapy is a promising direction in this area. The olfactory mucosa is considered the optimal source for obtaining cells for transplantation into the spinal cord. It is part of the peripheral nervous system and contains olfactory ensheathing cells and neural stem/progenitor cells (NSPCs) that have been shown to be effective in a number of experimental studies for the treatment of spinal cord injuries. However, the effectiveness of the use of cells of the olfactory lining in the treatment of post-traumatic cysts of the spinal cord has not been sufficiently studied.

In this work, a comparative assessment of the effectiveness of the use of olfactory ensheathing cells, NSPC and a combination of olfactory ensheathing cells and NSPC in post-traumatic spinal cord cysts was carried out. For this, the olfactory ensheathing cells and NSPCs were obtained according to the protocols developed by us (1,2) from the olfactory mucosa of rats (n = 30). Post-traumatic cysts were modeled using a modified method by Zhang C. (2015) (3). Olfactory ensheathing cells in the amount of 750 thousand (n = 9), NSPCs in the amount of 200 thousand (n = 5) and a combination of olfactory ensheathing cells and NSPCs (750 thousand and 200 thousand cells) (n = 3) were transplanted into the cyst area 4 weeks after the injury. The control group was injected with a medium without cells (n = 9). Before and after transplantation, an analysis of the size of cysts according to MRI data and an assessment of the dynamics of restoration of the motor activity of the hind limbs of rats according to the BBB scale was carried out.

It has been shown that a significant (p < 0.05) improvement in motor activity and a decrease in the size of cysts is observed only with the transplantation of olfactory ensheathing cells. Thus, the preparation of the parietal cells can be recommended for further research in the field of treatment of post-traumatic spinal cord cysts.

This work was supported by the Russian Science Foundation: Grant No. 17-15-01133.

References

1. Stepanova O.V., Voronova A.D., Chadin A.V., Valikhov M.P., Abakumov M.A., Reshetov I.V., Chekhonin V.P. Isolation of Rat Olfactory Ensheathing Cells and Their Use in the Therapy of Posttraumatic Cysts of the Spinal Cord // *Bull Exp Biol Med.* – 2018. – V. 165. – No 1. – P. 132-5.
2. Voronova A.D., Stepanova O.V., Valikhov M.P., Chadin A.V., Semkina A.S., Chekhonin V.P. Neural Stem/Progenitor Cells of Human Olfactory Mucosa for the Treatment of Chronic Spinal Cord Injuries // *Bull Exp Biol Med.* – 2020. – V. 168. – No 4. – P. 538-41.
3. Zhang C. Precise Delivery Into Chronic Spinal Cord Injury Syringomyelic Cysts with Magnetic Nanoparticles MRI Visualization // *Med Sci Monit.* – 2015. – V. 21. – P. 3179-85.

УДК: 577.352.4:612.419.014, ББК: 28.070 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-131-133

ВЫБОР ЭФФЕКТИВНОЙ НЕВИРУСНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ siРНК В КУЛЬТУРЫ ММСК

Е.В.Галицына, Т.Б.Бухарова, А.А.Буянова, К.С.Давыгора, Д.В.Гольдштейн

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Россия, 115478, Москва, Москворечье, 1, e-mail: snowbars888@yandex.ru, +79166512970

На основании сравнительной оценки эффективности 5 различных трансфекционных агентов с помощью молекул siРНК показано, что для культур ММСК предпочтительны агенты на основе катионных полимеров, а не липосом.

Ключевые слова: трансфекция ММСК, siРНК, липофекция, полиэтиленмин

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) являются одной из основных моделей для разработки методик в области генно-клеточных технологий для лечения множества заболеваний благодаря легкому получению от пациентов разных возрастных групп, высокому пролиферативному и дифференцировочному потенциалам. Кроме того, изменения, происходящие с ММСК *in vitro* наиболее полно отражают их поведение в моделях *in vivo*, в отличие от иммортализованных клеточных линий. Основная сложность в работе с данным типом клеток состоит в том, что ММСК, как и многие первичные культуры, относятся к труднотрансфицируемым.

Методы невирусной доставки нуклеиновых кислот (трансфекции) безопаснее вирусной трансдукции, хотя по данным многих авторов менее эффективны и могут быть токсичны. В связи с этим возникает потребность в поиске новых агентов и методик для повышения эффективности трансфекции ММСК.

Цель исследования. Сравнительная оценка эффективности 5 различных трансфекционных агентов:

1) наосновелипосом METAFECTENE® PRO (Biontech, США), Lipofectamine® 2000 и Lipofectamine® 3000 (Thermo Fisher Scientific, США);

2) наосновекатионныхполимеров TurboFect (Thermo Fisher Scientific, США) или линейный PEI (Polyscience, США).

ММСК, полученные из жировой ткани человека на 3 пассаже при достижении клеточной культурой 70-80% конfluентного монослоя трансфицировали липоплексами/полиплексами, состоящими из siРНК с флуоресцентной меткой 6-FAM в концентрации 50 пмоль/мкл и METAFECTENE® PRO, Lipofectamine® 2000, Lipofectamine® 3000 или TurboFect в соотношении 1:2, или PEI в соотношении 1:3 (мкг siРНК: мкл трансфекционного агента). Липоплексы/полиплексы формировали согласно рекомендациям производителя в DPBS или среде Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 20 минут. Трансфекцию проводили в 24-луночном культуральном планшете в 1 мл среды Opti-MEM с 5% ЭТС в течение 24 часов. Сразу после трансфекции и каждые 3 суток культурам производили замену среды на ДМЕМ, содержащей 10% ЭТС, 4 мМ L-глутамин, 100 мг/л амикацин.

Эффективность трансфекции оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. Цитотоксичность липоплексов/полиплексов анализировали на 1 и 7 сутки после проведения трансфекции с помощью МТТ-теста.

Наибольшую эффективность продемонстрировали трансфекционные агенты на основе катионных полимеров – TurboFect и PEI. Из трансфекционных агентов на основе липосом наибольшая эффективность была достигнута при использовании Lipofectamine® 3000 (таблица 1).

Таблица 1. Эффективность трансфекции и относительная жизнеспособность ММСК в присутствии липоплексов/полиплексов, образованных с помощью различных трансфекционных агентов

| Трансфекционный агент | Эффективность трансфекции, % | Относительная жизнеспособность клеток на 1 сутки, % | Относительная жизнеспособность клеток на 7 сутки, % |
|-----------------------|------------------------------|---|---|
| METAFECTENE® PRO | 19,52±1,82 | 98,18±5,3 | 99,33±4,28 |
| Lipofectamine® 2000 | 20,15±0,78 | 95,11±2,96 | 93,36±3,6 |
| Lipofectamine® 3000 | 78,02±18,44 | 85,2±4,38 | 58,37±2 |
| TurboFect | 87,53±9,92 | 95,39±3,51 | 61,15±15,36 |
| PEI | 97,67±0,67 | 86±3,4 | 16,54±1,53 |

По результатам МТТ-теста на 1 сутки эксперимента все трансфекционные агенты в составе липоплексов/полиплексов продемонстрировали незначительное снижение выживаемости клеток относительно значений контрольной группы. На 7 сутки наибольшую цитотоксичность показали TurboFect, Lipofectamine® 3000 и PEI. Незначительное снижение выживаемости клеток наблюдалось только в группах с METAFECTENE® PRO и Lipofectamine® 2000 – более 93% от значений контрольной группы (таблица 1).

Можно заключить, что наблюдается прямая зависимость между эффективностью трансфекции и выживаемостью клеток. Выживаемость клеток была достоверно значимо ниже в группах с наибольшей эффективностью показателей трансфекции ($p < 0,05$).

Наибольшую эффективность трансфекции продемонстрировали трансфекционные агенты на основе катионных полимеров – TurboFect и PEI. Из трансфекционных агентов на основе липосом наибольшая эффективность была достигнута при использовании Lipofectamine® 3000. Также TurboFect и Lipofectamine® 3000 умеренно влияют на жизнеспособность клеток через 7 суток после проведения трансфекции, что позволяет рекомендовать их в качестве высокоэффективных и относительно низкотоксичных агентов для трансфекции культур ММСК.

Финансирование: Работа выполнена за счет средств госзадания для ФГБНУ «МГНЦ»

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-131-133

DECIDING ON NON-VIRAL DELIVERY SYSTEM FOR siRNA TO MSCS

E.Galitsyna, T.Bukharova, A.Buianova, K.Davygora, D.Goldshtein

Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Centre for Medical Genetics", Russia, 115478, Moscow, Moskvorechye, 1

siRNA transfection efficiency comparative evaluation using 5 different agents showed preferability of agents based on cationic polymers rather than liposomes for MSCs

Key words: MSCs transfection, siRNA, lipofection, polyethylenimine

Mesenchymal stem cells (MSCs) are potential targets for cell and gene therapy based approaches against different diseases being easy to isolate from variously-aged patients, high proliferative and differentiation capacities. Moreover, changes in MSCs *in vitro* models better represent their behavior in *in vivo* models compared to immortalized cell lines. The main sticking point is that MSCs are known to be difficult to transfect, just like other primary cultures.

Non-viral nucleic acid delivery methods (transfection) are safer than viral transduction, although, according to variety of authors, they are less effective and may cause cytotoxicity. Therefore, new methods and agents for improvement of MSCs transfection efficiency need to be investigated.

Aim. Comparative evaluation of transfection efficiency and cytotoxicity of with 5 different transfecting agents:

1) liposome-based METAFECTENE® PRO (Biontex, США), Lipofectamine® 2000 и Lipofectamine® 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA);

2) cationic polymer based transfecting agents – TurboFect (Thermo Fisher Scientific, USA) and linear PEI (Polyscience, USA).

Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hADSCs) at the third passage upon reaching 70-80% the confluent cell culture monolayer, were transfected with lipopolyplexes/polyplexes composed of 6-FAM fluorescent labeled siRNA in 50 pmol/ μ l concentration and METAFECTENE® PRO, Lipofectamine® 2000, Lipofectamine® 3000 or TurboFect at a 1:2 N/P ratio, or PEI at a 1:3 N/P ratio (μ g of siRNA: μ l transfecting agent). Lipopolyplexes/polyplexes were formed corresponding to manufacture's recommendations in DPBS or Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, USA) medium within 20 min. Transfection was held in a 24-well culture plate with 1 ml 5% FBS-containing Opti-MEM medium (Thermo Fisher Scientific, USA) for 24 hours. Medium exchange using DMEM containing 5% FBS, 4mM L-glutamine and amikacin sulfate 100 mg/l was performed following transfection and each 3 days after.

The transfection efficiency control was performed by fluorescent microscopy and flow-cytofluorometry. Lipopolyplexes/polyplexes cytotoxicity was analyzed at 1st and 7th days after transfection with MTT-test.

Maximum efficiency was achieved with cationic polymer based transfecting agents – TurboFect and linear PEI. Lipofectamine® 3000 demonstrated largest efficiency among liposomal transfecting agents (table 1)

Table 1. Transfection efficiency and relative MSCs viability in the presence of lipopolyplexes/polyplexes formed with different transfecting agents.

| Transfection agent | Transfection efficiency, % | 1st day relative cell viability, % | 7th day relative cell viability, % |
|---------------------|----------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| METAFECTENE® PRO | 19,52±1,82 | 98,18±5,3 | 99,33±4,28 |
| Lipofectamine® 2000 | 20,15±0,78 | 95,11±2,96 | 93,36±3,6 |
| Lipofectamine® 3000 | 78,02±18,44 | 85,2±4,38 | 58,37±2 |
| TurboFect | 87,53±9,92 | 95,39±3,51 | 61,15±15,36 |
| PEI | 97,67±0,67 | 86±3,4 | 16,54±1,53 |

Based on 1st day MTT assay results all transfecting agents showed a slight decline of cell viability in relation to control group. On the 7th day the largest cytotoxicity demonstrated TurboFect, Lipofectamine® 3000 and PEI. A slight cell viability decline were observed only in groups with METAFECTENE® PRO and Lipofectamine® 2000 – more than 93% of control group values (table 1).

We infer that there is a direct relationship between transfection efficiency and cell survival. Cell viability was significantly lower in groups with highest transfection efficiency values ($p < 0,05$).

The greatest transfection efficiency was demonstrated by transfecting agents based on cationic polymers – TurboFect and PEI. Among liposome-based transfection agents, the highest efficiency was achieved using Lipofectamine® 3000. Also, TurboFect and Lipofectamine® 3000 have a moderate effect on cell viability on the 7th day after transfection, which allows us to recommend them as highly effective and relatively low-toxic agents for transfection of MSCs.

Grant: This work was supported by the state assignment for the Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics»

УДК 57.013:612.1 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-133-135

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ФАЗОВОГО ИМИДЖИРИНГА

Дерюгина А.В.¹, Золотова М.В.², Иващенко М.Н.³, Игнатьев П.С.⁴, Метелин В.Б.⁵, Таламанова М.Н.¹

¹ Институт биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

² Институт филологии и журналистики ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

³ ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия» Министерства сельского хозяйства РФ, e-mail: marina.31@rambler.ru

⁴ Производственное объединение «Уральский оптико-механический завод им. Э.С. Яламова»

⁵ ФГБОУ ВО «Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина», ГБУЗ «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»

Изучалась возможность применения количественного фазового имиджиринга для оценки структурно-морфологических особенностей эритроцитов при в норме и при стрессе. Установлено, что количественный фазовый имиджиринг является важным инструментом, позволяющим визуализировать красные клетки крови. Определены, новые аспекты воздействия стресса на функциональную морфологию клеток.

Ключевые слова: количественный фазовый имиджиринг, лазерная интерференционная микроскопия, фазовая высота, эритроциты, стресс.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-016-00195.

Эритроциты помимо газотранспортной функции, выполняют роль «клеточного дозиметра» действия экзо- и эндогенных факторов и уникальной клеточной модели для оценки состояния гомеостаза. Часть научных фактов касательно молекулярной организации эритроцита до сих пор носит описательный характер и требует дальнейшего изучения. В связи с этим возникает потребность в развитии новых способов получения информации о структурно-морфологических состояниях эритроцитов в целом и при стрессе.

Сегодня популярным направлением в исследовании клеток и субклеточных структур является количественный фазовый имиджинг (quantitative phase imaging – QPI). Очевидным достоинством метода является отсутствие дополнительных стадий обработки клеток: фиксации, окрашивания, обработки контрастирующими веществами, которые могут приводить к изменениям объекта исследования и возникновению артефактов. Количественный фазовый имиджинг позволяет проводить не только качественные и количественные оценки физиологического состояния клеток в определенный момент их развития, но и проследить динамику изменений этого состояния.

В связи с этим мы сосредоточили наше внимание на возможности практического использования метода при исследовании эритроцитов. Структурно-морфологические особенности красных клеток крови оценивали в режиме реального времени методом количественного фазового имиджинга с использованием лазерного интерференционного микроскопа МИМ-340 (Екатеринбург, Россия).

Проведенное исследование показало, что интактные эритроциты имеют типичную форму двояковогнутых дискоцитов, мембрана имеет ровную поверхность, распределение гемоглобина и показателя преломления равномерное. При стрессе геометрия клетки меняется – изменяется соотношение «поверхность/объем», происходит сферуляция эритроцитов, что свидетельствует об истощении ферментных систем клетки. Для количественной оценки морфофункционального состояния живых эритроцитов использовали параметр, называемый фазовой высотой клетки, которую определяли как максимальную высоту профиля относительно уровня подложки. По фазовому профилю эритроцита можно измерить фазовый диаметр клетки. У стрессированных эритроцитов наблюдается уменьшение фазовой высоты на 7%, а фазовая диаметр оказался сниженным на 5%.

Таким образом, использование возможностей количественного фазового имиджинга для неинвазивного исследования эритроцитов позволяет визуализировать красные клетки крови объективно оценивать их количественные и качественные признаки. При этом особое значение приобретает показатель фазовой высоты клетки, который позволяет оценить активность метаболизма клетки и может считаться объективным критерием оценки нарушений гомеостаза.

UDC 57.013:612.1 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-133-135

NEW POSSIBILITIES OF STRUCTURAL MORPHOLOGICAL PECULIARITIES INVESTIGATION BY QUANTITATIVE PHASE IMAGING METHOD

Deryugina A.V.¹, Zolotova M.V.², Ivashchenko M.N.³, Ignatiev P.S.⁴, Metelin V.B.⁵, Talamanova M.N.¹

¹ Institute of biology and Biomedicine Federal state Autonomous educational institution "National research Nizhny Novgorod state University Lobachevsky", 603950, Nizhny Novgorod, Gagarin Ave., 23

² Institute of Philology and Journalism Federal state Autonomous educational institution "National research Nizhny Novgorod state University Lobachevsky", 603950, Nizhny Novgorod, Gagarin Ave., 23

³ "Nizhny Novgorod state agricultural Academy" of the Ministry of agriculture, 603107, Nizhny Novgorod, Gagarin Ave., 97. e-mail: marina.31@rambler.ru

⁴ Production Association "Ural optical and mechanical plant named After E.S. Yalamov"

⁵ Kosygin Russian state University, Moscow regional research clinical Institute named after M.F. Vladimirov

The possibility of quantitative phase imaging method for the assessment of structural morphological erythrocytes peculiarities under normal and stress conditions were studied. It is stated that quantitative phase imaging is an important instrument which allows to visualize red blood cells. New aspects of stress influence on functional cells morphology are defined.

Key words: quantitative phase imaging, laser interference microscopy, phase height, erythrocytes, stress.

The research was done within the framework of Research №18-016-00195 of Russian Foundation of Basic Research.

Apart from gas transport function erythrocytes play the role of 'cell dosimeter' of the action of exo- and endogenic factors and unique cell model for homeostasis state assessment. A certain part of scientific factors, dealing with erythrocytes molecular organization, are still characterized by a descriptive nature and need further investigation. In this connection the necessity in the development of new ways of getting information on structural morphological erythrocytes states in the norm and under stress arises.

Nowadays quantitative phase imaging (QPI) is a popular direction in the investigation of cells and subcellular structures. An evident advantage of the method is the absence of cells processing additional stages: fixation, coloring, treatment with contrasting substances which may lead to the changes of the object under investigation

and artefacts appearance. Quantitative phase imaging allows to conduct not only qualitative and quantitative physiological state cells assessment in a given time of their development but also to trace the changes of this state dynamics.

In this connection we concentrated on this method practical application opportunity in erythrocytes investigation. Structural morphological peculiarities of red blood cells were assessed in real time regime by the method of quantitative phase imaging with the use of laser interference microscope MIM-340 (Ekaterinburg, Russia).

The conducted investigation showed that intact erythrocytes have a typical form of biconcave discocytes, membrane has a smooth surface, hemoglobin distribution and refractive indices are uniform. At stress cell's geometry is changing – the ratio "surface/ volume modifies, erythrocytes spherulation takes place -which demonstrates the exhaustion of the ferment cell systems. For quantitative assessment of morphological functional state of living erythrocytes the parameter called phase cell height which was defined as maximal height of the profile regarding the level of substrate was used. Using erythrocytes phase profile of it is possible to measure cell's phase diameter. Stressed erythrocytes demonstrate 7% decrease of phase height, phase diameter appeared 5% lower.

Thus the use of quantitative phase imaging capabilities for noninvasive erythrocytes investigation allows to visualize red blood cells, to assess objectively their quantitative and qualitative signs. The index of phase cell's height which allows to evaluate cell's metabolic activity and may be considered to be the objective criterion of homeostasis deviation assessment assumes special importance.

УДК 576.5+57.085.23+544.77 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-135-137

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА С ГЕПАТОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ НЕРG2 В УСЛОВИЯХ 2D- И 3D-КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Б.П. Челобанов, Ю.Е. Полетаева, А.В. Епанчинцева, А.В. Тупицына, Н.Б. Мосякин, Е.И. Рябчикова

*ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской Академии Наук
Новосибирск, Российская Федерация
630090 Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8
e-mail: lenryab@yandex.ru*

Обнаружен ранее не описанный феномен неспособности клеток поглощать наночастицы золота (НЧЗ) при изучении клеток линии НерG2 в условиях 2D- и 3D-культивирования (монослой и сфероиды). Эти же клетки поглощали НЧЗ, функционализированные полиэтиленимином.

Ключевые слова: наночастицы золота, поглощение, клетки НерG2, сфероиды.

Наночастицы золота (НЧЗ) широко используются в биомедицинских разработках; наноконструкции на их основе могут нести лекарственные субстанции, антитела и различные репортерные молекулы [1]. Целью работы было изучение взаимодействия охарактеризованных по физико-химическим свойствам НЧЗ с клетками линии НерG2 в условиях 2D- и 3D-культивирования (монослой и сфероиды). НЧЗ, функционализированные полиэтиленимином (НЧЗ-ПЭИ), использовали в качестве контроля; клетки НЕК293 - системы сравнения. В работе применяли методы 2D- и 3D-культивирования клеток, световой и просвечивающей электронной микроскопии, морфометрического анализа.

Инкубация семисуточных сфероидов и монослоя клеток НерG2 с НЧЗ (12-13 нм) установила неспособность клеток поглощать эти наночастицы. Напротив, эти же клетки активно поглощали НЧЗ-ПЭИ. Ранее нами показано поглощение аналогичных НЧЗ клетками различных культур, включая эпителиоидную линию MDCK, которая, как и клетки НерG2, имеет базолатеральную и апикальную поверхности, разделенные замыкающими комплексами [2-4]. Клетки НЕК293, инкубированные с НЧЗ или НЧЗ-ПЭИ, активно поглощали как НЧЗ, так и НЧЗ-ПЭИ. Таким образом, неспособность клеток НерG2 поглощать НЧЗ является их специфическим свойством и не связана со способом культивирования.

Выявленный нами феномен «нежелания» клеток взаимодействовать с НЧЗ в научной литературе не описан. Возможно, он не уникален, однако, на наш взгляд, феномен заслуживает внимания, поскольку его наличие может исказить результаты исследований. Природа этого явления непонятна и требует дополнительных исследований.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект №19-15-00217), синтез НЧЗ - Госпрограммой ИХБФМ СО РАН, проект № А0309-2016-0004.

Литература

1. Falahati M., Attar F., Sharifi M., Saboury A.A., Salihi A.5, Aziz F.M., Kostova I., Burda C., Prielcel P., Lopez-Sanchez J.A., Laurent S., Hooshmand N., El-Sayed M.A. Gold nanomaterials as key suppliers in biological and chemical sensing, catalysis, and medicine//*Biochem Biophys Acta Gen Subj.* 2020. Vol.1864. №1. P.129435.
2. Pyshnaya I.A., Razum K.V., Poletaeva J.E., Pyshnyi D.V., Zenkova M.A., Ryabchikova E.I. Comparison of Behaviour in Different Liquids and in Cells of Gold Nanorods and Spherical Nanoparticles Modified by Linear Polyethyleneimine and Bovine Serum Albumin//*BioMed Res Int.* 2014. Vol.1979. P.908175.
3. Razum K.V., Troitski S.Y., Pyshnaya I.A., Bukhtiyarov V.I., Ryabchikova E.I. Macrophages and Epithelial Cells Differently Respond to Palladium Nanoparticles//*Micro and Nanosystems.* 2014. Vol.6. №2. P.133–141.
4. Poletaeva J., Dovydenko I., Epanchintseva A., Korchagina K., Pyshnyi D., Apartsin E., Ryabchikova E., Pyshnaya I. Non-Covalent Associates of siRNAs and AuNPs Enveloped with Lipid Layer and Doped with Amphiphilic Peptide for Efficient siRNA Delivery//*Int J Mol Sci.* 2018. Vol.19. №7. P. E2096.

UDC: 576.5+57.085.23+544.77 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-135-137

INTERACTION OF GOLD NANOPARTICLES WITH HUMAN HEPATOCYTES HEPG2 LINE UNDER CONDITIONS OF 2D- AND 3D-CULTIVATION

B.P. Chelobanov, J.E. Poletaeva, A.V. Epanchintseva, A.V. Tupitsyna, N.B. Mosyakin, E.I. Ryabchikova.

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
Novosibirsk, Russian Federation
630090 Novosibirsk, Lavrentiev av., 8
e-mail: lenryab@yandex.ru*

A previously undescribed phenomenon of the inability of cells to uptake gold nanoparticles (GNPs) was discovered when studying HepG2 cells under the conditions of 2D- and 3D- cultivation (monolayer and spheroids). The same cells readily internalized GNPs functionalized with polyethyleneimine.

Key words: gold nanoparticles, internalization, HepG2 cells, spheroids.

Gold nanoparticles (GNPs) are widely used in biomedical research; nanoconstructions based on them can carry drug substances, antibodies, and various reporter molecules [1]. The aim of this work was to study the interaction of GNPs, characterized by the physicochemical properties, with HepG2 cells under the conditions of 2D- and 3D-cultivation (monolayer and spheroids). Polyethyleneimine functionalized GNPs (GNP-PEI) were used as a control; HEK293 cells were used as a comparison system. In the work, we used the methods of 2D- and 3D- cell cultivation, light and transmission electron microscopy, and morphometric analysis.

Incubation of seven-day-old spheroids and a monolayer of HepG2 cells with GNPs (12–13 nm) established the inability of cells to internalize these nanoparticles. At the same time, these cells actively internalized GNP-PEI. Earlier, we showed the uptake of similar GNPs by cells of various cultures, including the MDCK epithelioid line, which, like HepG2 cells, has basolateral and apical surfaces separated by tight junctions [2-4]. The study of HEK293 cells incubated with GNPs or GNP-PEI showed that they actively internalize both GNPs and GNP-PEI. Thus, the inability of HepG2 cells to internalize GNPs is their specific feature and is not related to the cultivation conditions.

The phenomenon of cell “unwillingness” to interact with GNPs has not been described in the scientific literature. Probably it is not unique, however, in our opinion; the phenomenon deserves attention, since its presence can distort the results of research. The nature of this phenomenon is unclear and requires additional research.

This work was supported by the Russian Science Foundation (project # 19-15-00217), synthesis of GNPs - by the State Program of the ICBFM SB RAS, project # A0309-2016-0004.

References

1. Falahati M., Attar F., Sharifi M., Saboury A.A., Salihi A.5, Aziz F.M., Kostova I., Burda C., Prielcel P., Lopez-Sanchez J.A., Laurent S., Hooshmand N., El-Sayed M.A. Gold nanomaterials as key suppliers in biological and chemical sensing, catalysis, and medicine//*Biochem Biophys Acta Gen Subj.* 2020. Vol.1864. №1. P.129435.
2. Pyshnaya I.A., Razum K.V., Poletaeva J.E., Pyshnyi D.V., Zenkova M.A., Ryabchikova E.I. Comparison of Behaviour in Different Liquids and in Cells of Gold Nanorods and Spherical Nanoparticles Modified by Linear Polyethyleneimine and Bovine Serum Albumin//*BioMed Res Int.* 2014. Vol.1979. P.908175.

3. Razum K.V., Troitski S.Y., Pyshnaya I.A., Bukhtiyarov V.I., Ryabchikova E.I. Macrophages and Epithelial Cells Differently Respond to Palladium Nanoparticles//Micro and Nanosystems. 2014. Vol.6. №2. P.133–141.
4. Poletaeva J., Dovydenko I., Epanchintseva A., Korchagina K., Pyshnyi D., Apartsin E., Ryabchikova E., Pyshnaya I. Non-Covalent Associates of siRNAs and AuNPs Enveloped with Lipid Layer and Doped with Amphiphilic Peptide for Efficient siRNA Delivery//Int J Mol Sci. 2018. Vol.19. №7. P. E2096.

УДК 577.17; 577.12.05 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-137-138

ГИБРИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ МАГНЕТИТ-ЗОЛОТО ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Ефремова М.В.^{1,2}, Наленч Ю.А.², Миrowsали Э.³, Гаранина А.С.^{1,2}, Абакумов М.А.^{2,4}, Спасова М.⁵, Ангелакерис М.³, Фарле М.⁵, Мажуга А.Г.^{1,2,6}, Видвальд У.^{2,5}, Клячко Н.Л.¹

¹ Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии, Москва, Россия

119991, Москва, Ленинские горы, 1-11Б

² Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва, Россия

119049, Москва, Ленинский пр., д. 4

³ Университет Салоники им. Аристотеля, физический факультет, Салоники, Греция

54124, Салоники, Университетский кампус

⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

⁵ Университет Дуйсбург-Эссен, Физический факультет и Центр Наноинтеграции Дуйсбург, Германия

47057, Дуйсбург, Лотарштрассе, д. 1

⁶ Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, Москва, Россия

125047, Москва, Миусская пл., 9

e-mail: efremova33@mail.ru

В работе получены гибридные наночастицы магнетит-золото, которые обладают высокими контрастными характеристиками в магнитно-резонансной томографии и тепловыделительными характеристиками в гипертермии магнитных частиц, продемонстрированными *in vitro*.

Ключевые слова: наночастицы, магнетит-золото, контрастные агенты, магнитно-резонансная томография, онкологические заболевания, диагностика, тераностика.

Магнетит Fe_3O_4 и золото Au – материалы выбора для биомедицинских применений вследствие их стабильности и биосовместимости. В данной работе впервые представлено исследование размерно-зависимых свойств гибридных наночастиц (НЧ) Fe_3O_4 -Au для тераностики диаметром 6-44 нм Fe_3O_4 и 3-11 нм Au, сочетающее в себе оптимизацию контрастных свойств в магнитно-резонансной томографии (МРТ) и тепловыделительных свойств в гипертермии магнитных частиц (ГМЧ). Гибридные НЧ размером менее 20 нм обладают суперпарамагнитными свойствами. При дальнейшем увеличении диаметра НЧ становятся термически заблокированными, и на ZFC / FC кривых наблюдается переход Вервея как показатель высокого качества кристаллической структуры и магнитных свойств объемного Fe_3O_4 .

В МРТ с увеличением диаметра НЧ с 6 до 25 нм наблюдался рост r2-релаксивности с 159 до 495 $mM^{-1}s^{-1}$ в воде и с 118 до 612 $mM^{-1}s^{-1}$ в матрице агарозного геля, имитирующего вязкость цитоплазмы клеток. Полученные значения для НЧ размером 25 и 44 нм значительно превосходят аналогичные данные для гибридных НЧ Fe_3O_4 -Au, взятые из литературы, а также соответствующие величины для коммерческих контрастных агентов. По всей вероятности, это является следствием идеальной кристалличности НЧ и объемной намагнитченности насыщения, что приводит к большим градиентам поля в МРТ. Согласно данным ГМЧ, при увеличении диаметра наночастиц с 6 до 25 нм удельная мощность тепловыделения НЧ увеличивалась с 10 до 617 Вт·г Fe^{-1} в воде и с 12 до 327 Вт·г Fe^{-1} в агарозе. При этом НЧ размером 25 нм и 44 нм демонстрируют схожие характеристики.

В экспериментах *in vitro* была обнаружена гибель клеток аденокарциномы молочной железы мыши 4T1 на уровне $79 \pm 8\%$ после инкубации с гибридными НЧ Fe_3O_4 -Au размером 25 нм в течение 30 мин в магнитном поле частотой 261-393 кГц и амплитудой 25 мТл. Предварительная инкубация клеток с НЧ в течение 6 часов до обработки полем привела к полной (100%) гибели клеток.

Таким образом, многофункциональные гибридные НЧ Fe_3O_4 -Au сочетают в себе оптимальные характеристики в МРТ и ГМЧ и демонстрируют высокий потенциал для терапии и визуализации как

магнитоуправляемая платформа для тераностики онкологических заболеваний.

Работа частично поддержана грантами РФФИ 18-33-01232 мол_а, 17-54-33027, 18-29-09154, темой Гос. Регистрации АААА-А16-116052010081-5, Программой развития МГУ, а также программой повышения конкурентоспособности НИТУ «МИСиС» № К3-2017-022.

UDK 577.17; 577.12.05 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-137-138

HYBRID MAGNETITE-GOLD NANOPARTICLES FOR TERANOSTICS OF ONCOLOGICAL DISEASES

Efremova M.V.^{1,2}, **Nalench Yu.A.**², **Myrovali E.**³, **Garanina A.S.**^{1,2}, **Abakumov M.A.**^{2,4}, **Spasova M.**⁵, **Angelakeris M.**³, **Farle M.**⁵, **Majouga A.G.**^{1,2,6}, **Wiedwald U.**^{2,5}, **Klyachko N.L.**¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Department of Chemical Enzymology, Moscow, Russia 119991, Moscow, Leninskiye Gory, 1-11B

² National University of Science and Technology «MISIS», Moscow, Russia 119049, Moscow, 4-B Leninsky prospect

³ Aristotle University of Thessaloniki, Physics Department, Thessaloniki, Greece 54124, Thessaloniki, University Campus

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia 117997, Moscow, 1 Ostrovityanova st.

⁵ University of Duisburg-Essen, Faculty of Physics and Center for Nanointegration Duisburg-Essen, Duisburg, Germany 47057, Duisburg, 1 Lotharstrasse

⁶ D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia 125047, Moscow, 9 Miusskaya pl.

e-mail: efremova33@mail.ru

In this work, hybrid magnetite-gold nanoparticles have been obtained, which have high contrast characteristics in magnetic resonance imaging and heat-release characteristics in magnetic particle hyperthermia, demonstrated *in vitro*.

Key words: nanoparticles, magnetite-gold, contrast agents, magnetic resonance imaging, oncological diseases, diagnostics, theranostics.

Magnetite Fe₃O₄ and gold Au are the materials of choice for biomedical applications due to their stability and biocompatibility. In this work, we present the first size-dependent study of hybrid Fe₃O₄-Au NPs with diameters of 6-44 nm Fe₃O₄ and 3-11 nm Au for theranostics combining the contrast enhancement in magnetic resonance imaging (MRI) and the heating potential in magnetic particle hyperthermia (MPH). Hybrids below 20 nm are superparamagnetic. With further increase of the diameter, the NPs are thermally blocked and the Verwey transition is observed in ZFC/FC curves as an indicator of high quality, bulk-like Fe₃O₄.

For MRI, we observe the growth of the r₂-relaxivity from 159 to 495 mM⁻¹s⁻¹ in water and from 118 to 612 mM⁻¹s⁻¹ in agarose gel matrices, mimicking tissues, with increasing NP diameter from 6 to 25 nm. Our best values are significantly enhanced in comparison to other Fe₃O₄-Au hybrids or commercial contrast agents due to the perfect crystallinity and large bulk-like saturation magnetization leading to larger field gradients in MRI. MPH measurements deliver the specific loss power, increasing from 10 to 617 W·gFe⁻¹ in water and from 12 to 327 W·gFe⁻¹ in agarose with increasing NP diameter from 6 to 25 nm. The 25 nm and 44 nm NPs show similar theranostic performance.

In *in vitro* experiments, we detect the death of 4T1 mouse breast cancer cells at a rate of 79±8% after exposure to 25 nm Fe₃O₄-Au hybrids for 30 min in 261-393 kHz, 25 mT magnetic field. Pre-incubation of cells with the hybrids for 6h leads to complete (100%) cell death.

Therefore, multifunctional Fe₃O₄-Au hybrid NPs combine the optimal characteristics for MRI and MPH and promise the highest potential for therapeutic and visualization capabilities in magnetism-based theranostics.

This work was supported by RFBR grants 18-33-01232, 17-54-33027, 18-29-09154, State Topic AAA-A16-116052010081-5, MSU Program of Development, and the Increase Competitiveness Program of NUST MISIS K3-2017-022.

УДК 576.3+612.014.2/3 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-139-141

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НОРМАЛЬНЫХ И РАКОВЫХ КЛЕТКОК *IN VITRO* ПРИ РАЗНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ДЕЙТЕРИЯ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ

Злацкий И.А.^{1,2}, Антипова Н.В.^{1,3}, Злацкая А.В.^{2,4}, Васильев Р.Г.², Зубов Д.А.², Новикова С.Н.², Сыроешкин А.В.¹

¹ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

² Институт генетической и регенеративной медицины НАМНУ, Киев, Украина

³ Институт биоорганической химии им. Шенякина – Овчинникова РАН, Москва, Россия

⁴ Биотехнологическая лаборатория, медицинская компания Илая, Киев, Украина

e-mail: zlatkiy@ukr.net

В настоящем исследовании мы показали, что нормальные и раковые клетки *in vitro* в дейтерированной ростовой среде демонстрируют снижение митохондриальной активности (МА), а в обедненной дейтерием среде повышение.

Ключевые слова: дейтерий, митохондриальная активность, родамин, митотрекер.

Было отмечено, что кинетика биологических реакций зависит от соотношения дейтерий/протий (D/H) в водных растворах [1-3]. Целью нашего исследования было изучение МА нормальных и раковых клеток *in vitro* при различной концентрации дейтерия.

Для приготовления питательных сред использовалась вода с различным содержанием дейтерия: вода, обедненная дейтерием (ddw, конц. D 0,016 M), дейтерированная вода (конц. D 56 M) (все "Sigma-Aldrich", США) вода с естественным содержанием дейтерия (MiliQ, Великобритания) (конц. D 0,24 M) служила контролем. Содержание дейтерия контролировали Isotopic Water Analyzer-912-0032 (Los Gatos Research Inc., США). Исследовали полученные из жировой ткани мезенхимальные стволовые клетки (ADSCs) в процессе адиподифференцировки и раковые линии SKOV3, U87, HT29, MCF7, JURCAT, ZR-75-1, Макрофаги (мыши), β -клетки (мыши). ADSCs были выделены из образцов жировой ткани пациентов, подвергшихся липосакции. Было получено письменное информированное согласие каждого пациента. Раковые линии были получены из Американской коллекции типовых культур (ATSS). Все процедуры культивирования и оценки МА проводили по стандартному протоколу и согласно рекомендации производителя. Анализ МА проводили с помощью флуоресцентного красителя Митотрекер (Thermo Fisher, США) в ADSCs и Родамин 123 (Thermo Fisher, США) в раковых клеточных линиях на спектрофлуориметре (Labsystems Multiskan PLUS, США). Отдельно при адиподифференцировке было проведено RT-qPCR анализ экспрессии гена UCP1.

Исследование показало (рис. 1), что наиболее интенсивная МА наблюдается в нормальных и раковых клеточных линиях *in vitro*, культивируемых в питательной среде ddw. Ростовая среда с высокой концентрацией дейтерия (D20) ингибировала МА.

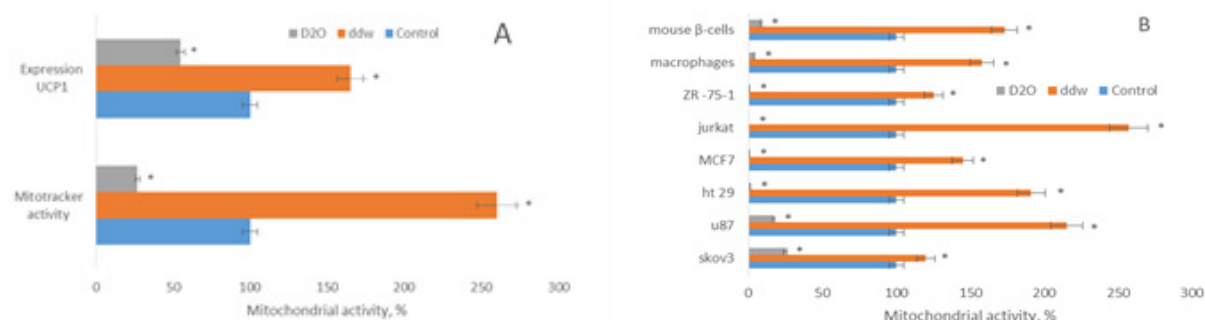


Рис. 1. Диаграмма МА нормальных (А) и раковых (В) клеток *in vitro* при различной концентрации D. (Mean \pm SD n=6, * - p < 0,01 с контрольной группой).

Работа выполнена при поддержке программы «РУДН 5-100».

Литература

1. Syroeshkin, A.V., Pleteneva, T.V., Uspenskaya, et al. D/H control of chemical kinetics in water solutions under low deuterium concentrations // Chemical Engineering Journal. 2019. Vol. 377. P. 119827. doi:10.1016/j.cej.2018.08.213

2. Basov A., Fedulova L., Vasilevskaya, E., Dzhimak S. Possible mechanisms of biological effects observed in living systems during 2H/1H isotope fractionation and deuterium interactions with other biogenic isotopes // *Molecules*. 2019. Vol. 24. P. 4101.
3. Zlatska A., Gordiienko I., Vasyliov R., et al. *In vitro* study of deuterium effect on biological properties of human cultured adipose-derived stem cells // *The Scientific World Journal*. Volume 2018. Article ID 5454367. doi: 10.1155/2018/5454367

UDC 576.3+612.014.2/3 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-139-141

MITOCHONDRIAL ACTIVITY OF NORMAL AND CANCER CELLS *IN VITRO* AT DIFFERENT CONCENTRATION OF DEUTERIUM IN CULTURE MEDIUM

Zlatskiy I.A.^{1,2}, Antipova N.V.^{1,3}, Zlatska A.V.^{2,4}, Vasyliov R.G.², Zubov D.A.², Novikova S.N.², Syroeshkin A.V.¹

¹ Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

² State Institute of Genetic and Regenerative Medicine of NAMS of Ukraine, Kiev, Ukraine

³ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia

⁴ Biotechnology Laboratory ilaya regeneration, medical company ilaya, Kiev, Ukraine
 e-mail: zlatskiy@ukr.net

In the present study, we showed that normal and cancer cells *in vitro* in a deuterated growth medium show a decrease of mitochondrial activity (MA), while in a deuterium-depleted medium an increase.

Key words: deuterium, mitochondrial activity, rhodamine, mitotracker.

It was noted that the kinetics of biological reactions depends on the ratio of deuterium/protium (D/H) in aqueous solutions [1-3]. The aim of our investigation was to study the MA of normal and cancer cells *in vitro* at various concentrations of deuterium.

For the culture media preparation, water with various deuterium contents was used: deuterium depleted water (ddw, conc. D 0,016 M), deuterated water (D2O conc. D 56 M) (all Sigma-Aldrich, USA) water with a natural deuterium content (MiliQ, UK) (conc. D 0,24 M) served as a control. The deuterium content was controlled by Isotopic Water Analyzer-912-0032 (Los Gatos Research Inc., USA). We studied adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) during adipogenic differentiation and cancer lines: SKOV3, U87, HT29, MCF7, JURCAT, ZR-75-1, mouse macrophages, mouse β -cells. ADSCs were isolated from adipose tissue samples from patients undergoing liposuction. Written informed consent was obtained from each patient. Cancer lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATSS). All cultivation and evaluation procedures were performed according to the standard protocol and according to the recommendations of the dyes manufacturer. MA analysis was performed using a fluorescent dyes: Mitotraker (Thermo Fisher, USA) in ADSCs and Rhodamine 123 (Thermo Fisher, USA), in cancer cell lines on a spectrofluorimeter (Labsystems Multiskan PLUS, USA). Separately, adipogenic differentiation was performed by RT-qPCR analysis of UCP1 gene expression.

The study showed (Fig. 1) that the most intense MA is observed in normal and cancer cell lines *in vitro* cultured in ddw medium. Growth medium with a high concentration of deuterium (D2O) inhibited MA.

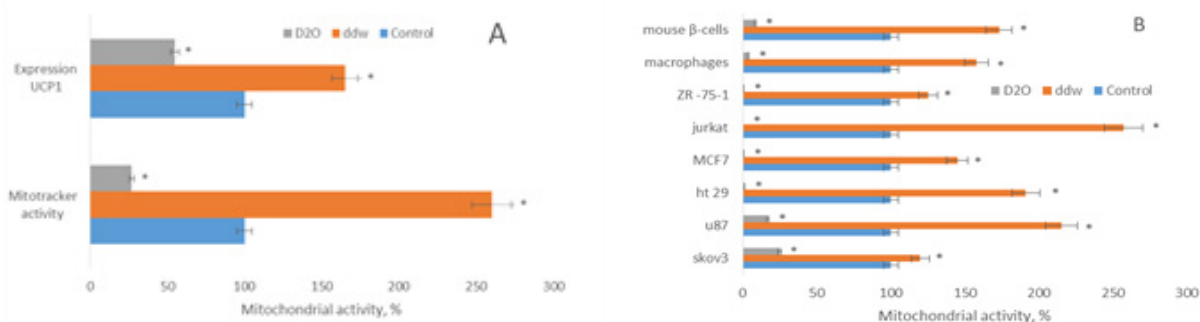


Fig.1. *In vitro* MA diagram of normal (A) and cancer (B) cells at various concentrations of D. (Mean \pm SD n=6, * - p < 0.01 comparison with the control group).

The publication has been prepared with the support of the "RUDN University Program 5-100".

References

1. Syroeshkin, A.V., Pleteneva, T.V., Uspenskaya, et al. D/H control of chemical kinetics in water solutions under low deuterium concentrations // *Chemical Engineering Journal*. 2019. Vol. 377. P. 119827. doi:10.1016/j.cej.2018.08.213
2. Basov A., Fedulova L., Vasilevskaya, E., Dzhimak S. Possible mechanisms of biological effects observed in living systems during 2H/1H isotope fractionation and deuterium interactions with other biogenic isotopes // *Molecules*. 2019. Vol. 24. P. 4101.
3. Zlatska A., Gordienko I., Vasyliov R., et al. *In vitro* study of deuterium effect on biological properties of human cultured adipose-derived stem cells // *The Scientific World Journal*. Volume 2018. Article ID 5454367. doi: 10.1155/2018/5454367

УДК 616.89 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-141-143

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ПРИ ЭНДОГЕННЫХ ПСИХОЗАХ

Зоркина Я.А.¹, Морозова А.Ю.^{1,2}, Павлов К.А.¹, Резник А.М.², Костюк Г.П.²

¹ Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского, Москва, Россия.

119034, г. Москва, Кропоткинский пер., д. 23

² ПКБ им. Н.А.Алексеева ДЗМ, Москва, Россия

e-mail: Zorkina.ya@serbsky.ru

На группе пациентов с эндогенными психозами выявлены ассоциации генетических полиморфизмов серотонинового рецептора второго А типа и дофаминового рецептора 3 типа с заболеванием при анализе случай-контроль.

Ключевые слова: шизофрения, COMT, HTR2A, DRD3, SNP

Шизофрения тяжелое психическое расстройство с разнообразными симптомами включающие позитивные, такие как бред, галлюцинации, негативные, социальная отгороженность, потеря интересов, неорганизованное мышление и речь, различные когнитивные дисфункции. Заболевание приводит к потере трудоспособности на длительный период времени и раннему установлению инвалидности. Близнецовые исследования показывают конкордантность шизофрении около 60-80%. Наличие положительной семейной истории психических заболеваний может дать прогноз к более тяжёлому течению болезни (Perper E.J. et al. в 2018). Это говорит о том, что генетические факторы вносят свой вклад в развитие болезни.

В нашей работе мы проводили исследования однонуклеотидных полиморфизмов катехол-о-метилтрансферазы (COMT) rs4680, серотонинового рецептора второго А типа (HTR2A) rs7322347, дофаминового рецептора 3 типа (DRD3) rs6280 у пациентов с эндогенными психозами. Распределение аллелей в выборке подчинялось закону Харди-Вайнберга, в связи с чем дальнейший анализ ассоциаций оказался возможен.

Определение однонуклеотидных полиморфизмов проводили при помощи технологии высокочувствительного анализа кривых плавления с использованием специфических TaqMan-зондов. Российская популяция пациентов проходила стационарное лечение в психиатрической больнице им. Алексеева, с диагнозами по МКБ-10 F20, F22-25 (мужчины-345, женщины-310). Контролем являлась группа здоровых волонтеров, которые сдавали кровь в банк Центра крови им. О.К.Гаврилова. Все пациенты дали добровольное согласие на участие в исследовании.

HTR2A rs7322347

Гипотетическими причинами предрасположенности к шизофрении в фокусе изучения гена HTR2A являются: увеличение эффективности (потенциала действия) серотонина в ЦНС приводит к функциональному дисбалансу с другими нейротрансмиттерами (норадреналин, дофамин), нарушение нормальной активации рецепторов серотонина за счет полиморфизмов рецептора серотонина, изменение количества рецепторов на клетках-мишенях. Полиморфизм rs7322347 гена HTR2A ранее ассоциировался с посттравматическим стрессовым расстройством Miller (2020), синдромом гиперактивности и дефицита внимания Pinto (2016), с агрессией Banlaki (2015). В нашем исследовании ассоциации данного полиморфизма с диагнозом шизофрения в исследовании случай-контроль были показаны впервые (p=0,005).

COMT rs4680

Фермент, который участвует в распаде катехоламинов (адреналина, норадреналина и дофамина). Ген COMT содержит однонуклеотидную замену G472A в экзоне 4, результатом которой является замещение аминокислоты валин на метионин (полиморфизм Val158Met). Эта замена ведет к нарушению его активности. Особенности строения гена катехол-О-метилтрансферазы связывают с активностью рабочей памяти,

способностью к многозадачности, тревожностью, более высоким уровнем организации регуляторных (управляющих) функций, импульсивностью. Несмотря на то, что многие исследователи показали ассоциации с данным полиморфизмом, в нашем исследовании этого не было выявлено ($p=0,84$).

DRD3 rs6280

DRD3 рецепторы участвуют в механизмах аффективных реакций и когнитивных процессах. Ген рецептора дофамина D3 широко исследован и считается геном-кандидатом в отношении шизофрении: у пациентов с этим заболеванием обнаружено повышение плотности рецепторов D3 в области стриатума с относительным накоплением «усеченных форм» рецепторного белка, образующихся при аномальном сплайсинге. Полиморфный локус rs6280 представляет собой однонуклеотидную замену С/Т, приводящую к замене серина на остаток глицина в позиции. Показано, что у носителей генотипа Gly/Gly отмечается самая высокая активность рецептора дофамина D3. Полиморфизм наиболее значим для безопасности психотропной терапии. Носительство Gly9Gly генотипа достоверно ассоциировано с поздней дискинезией при назначении даже атипичных антипсихотиков. В нашем исследовании показаны ассоциации данного полиморфизма с диагнозом шизофрения в исследовании случай-контроль ($p=0,007$).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-29-02164.

Литература

1. Pepper EJ, Pathmanathan S, McIlrae S, Rehman FU, Cardno AG. Associations between risk factors for schizophrenia and concordance in four monozygotic twin samples. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2018 Jul;177(5):503-510. doi: 10.1002/ajmg.b.32640.
2. Miller MW. Leveraging genetics to enhance the efficacy of PTSD pharmacotherapies. *Neurosci Lett.* 2020 May 1;726:133562. doi: 10.1016/j.neulet.2018.04.039.
3. Pinto R, Asherson P, Ilott N, Cheung CH, Kuntsi J. Testing for the mediating role of endophenotypes using molecular genetic data in a twin study of ADHD traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2016 Oct;171(7):982-92. doi: 10.1002/ajmg.b.32463.
4. Banlaki Z, Elek Z, Nanasi T, Szekely A, Nemoda Z, Sasvari-Szekely M, Ronai Z. Polymorphism in the serotonin receptor 2a (HTR2A) gene as possible predisposal factor for aggressive traits. *PLoS One.* 2015 Feb 6;10(2):e0117792. doi: 10.1371/journal.pone.0117792.

UDC 616.89 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-141-143

ASSOCIATION OF GENETIC POLYMORPHISMS WITH ENDOGENOUS PSYCHOSIS

Zorkina Ya.A.¹, Morozova A.Yu.^{1,2}, Pavlov K.A.¹, Reznik A.M.², Kostuyk G.P.²

¹ V.P. Serbsky National Medical Research Center for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia. 119034, Moscow, Kropotkinsky lane, 23.

² N.A. Alekseev Psychiatric Clinical Hospital № 1, Moscow, Russia Zorkina.e-mail: ya@serbsky.ru

The group of patients with endogenous psychosis revealed associations of genetic polymorphisms of type 2 A serotonin receptor and type 3 dopamine receptor with the disease in case-control analysis.

Key words: schizophrenia, COMT, HTR2A, DRD3, SNP

Schizophrenia is a severe mental disorder with a variety of symptoms including positive, such as delusions, hallucinations, negative, social isolation, loss of interest, unorganized thinking and speech, various cognitive dysfunctions. The disease leads to long-term disability and early detection of disability. Twin studies show a concordance of schizophrenia of about 60-80%. The presence of a positive family history of mental illness may predict a more severe course of the disease (Pepper E.J. et al. in 2018). This indicates that genetic factors contribute to the development of the disease.

In our work we have conducted studies of single-nucleotide polymorphisms of catechol-methyltransferase (COMT) rs4680, type 2 A serotonin receptor (HTR2A) rs7322347, type 3 dopamine receptor (DRD3) rs6280 in patients with endogenous psychosis. The distribution of alleles was subject to the Hardy-Weinberg equilibrium, so further analysis of the associations was possible.

Single-nucleotide polymorphisms were determined using the technology of highly sensitive melting curve analysis using specific TaqMan probes. The Russian population of patients was undergoing inpatient treatment in Alekseev Psychiatric Hospital, diagnosed with F20, F22-25 (men-345, women-310). The control was a group of healthy volunteers, who donated blood to the Bank of the Blood Center named after O.K.Gavrilov. All patients gave their voluntary consent to participate in the study.

HTR2A rs7322347

Hypothetical reasons for the predisposition to schizophrenia in the focus of study of the HTR2A gene are: increased serotonin efficiency (action potential) in the CNS leads to a functional imbalance with other neurotransmitters (noradrenaline, dopamine), impaired normal activation of serotonin receptors due to serotonin receptor polymorphisms, changes in the number of receptors on target cells. The rs7322347 polymorphism of the HTR2A gene was previously associated with post-traumatic stress disorder (Miller 2020), attention deficit hyperactivity disorder (Pinto 2016), and aggression (Banlaki 2015). In our study, the association of this polymorphism with the diagnosis of schizophrenia in the case-control study was shown for the first time ($p=0.005$).

COMT rs4680

An enzyme that participates in the breakdown of catecholamines (adrenaline, noradrenaline and dopamine). The COMT gene contains a single-nucleotide polymorphism, which results in the replacement of valine amino acids for methionine (polymorphism Val158Met). This leads to the disturbance of its activity. Features of the catechol-O-methyltransferase gene structure are associated with the activity of the working memory, the ability to multitask, anxiety, a higher level of organization of regulatory (control) functions, impulsivity. Despite the fact that many researchers have shown associations with this polymorphism, this was not found in our study ($p=0.84$).

DRD3 rs6280

DRD3 receptors participate in affective reaction mechanisms and cognitive processes. The dopamine D3 receptor gene has been widely researched and is considered to be a candidate genome for schizophrenia: in patients with this disease, an increase in D3 receptor density has been detected in the striatum region with a relative accumulation of "truncated forms" of receptor protein produced by abnormal splicing. The polymorphic locus rs6280 is a single-nucleotide C/T replacement resulting in a replacement serine/glycine. It has been shown that Gly/Gly genotype have the highest activity of dopamine D3 receptor. Polymorphism is the most important for the safety of psychotropic therapy. Gly9Gly genotype are reliably associated with dyskinesia when prescribing even atypical antipsychotics. Our study shows associations of this polymorphism with the diagnosis of schizophrenia in a case-control study ($p=0.007$).

This work was supported by RFBR grant 17-29-02164.

References

1. Pepper EJ, Pathmanathan S, McIlrae S, Rehman FU, Cardno AG. Associations between risk factors for schizophrenia and concordance in four monozygotic twin samples. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2018 Jul;177(5):503-510. doi: 10.1002/ajmg.b.32640.
2. Miller MW. Leveraging genetics to enhance the efficacy of PTSD pharmacotherapies. *Neurosci Lett.* 2020 May 1;726:133562. doi: 10.1016/j.neulet.2018.04.039.
3. Pinto R, Asherson P, Iliott N, Cheung CH, Kuntsi J. Testing for the mediating role of endophenotypes using molecular genetic data in a twin study of ADHD traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2016 Oct;171(7):982-92. doi: 10.1002/ajmg.b.32463.
4. Banlaki Z, Elek Z, Nanasi T, Szekely A, Nemoda Z, Sasvari-Szekely M, Ronai Z. Polymorphism in the serotonin receptor 2a (HTR2A) gene as possible predispositional factor for aggressive traits. *PLoS One.* 2015 Feb 6;10(2):e0117792. doi: 10.1371/journal.pone.0117792.

УДК 615.035 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-143-146

ДЛИННОЦЕПОЧЕЧНЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ (ЭЙКОНОЛ) В ДИАГНОСТИКЕ И КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ ПРИ ДИСЦИРКУЛЯТОРНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Исаев В. А., Симоненко С.В.

НИИ детского питания - филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Истра, Россия
143500, Московская область г. Истра, ул. Московская, 48
e-mail: info@niidp.ru

Целью исследования явилась оценка влияния Эйконола на мозговой кровоток (МК) у больных ИБС в сравнении с наиболее распространенными сердечно-сосудистыми препаратами.

Ключевые слова: мозаичность мозгового кровообращения, ксенон-133, Эйконол, ИБС, дисциркуляторная энцефалопатия, нитроглицерин, коринфар, нитро-ник, ломир, тенормин, квинаприл, миокард, стенокардия, ПНЖК Омега -3.

В многочисленных публикациях было показано, что длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) класса омега-3 оказывают положительное влияние на кровообращение у больного атеросклерозом [1,2].

В связи с этим целью исследования явилась оценка влияния Эйконола на мозговой кровоток (МК) у больных ИБС в сравнении с наиболее распространенными сердечно-сосудистыми препаратами. Такими как пролонгированные формы нитратов (нитро-ник), антагонистов кальция (ломир), бета-блокаторов (тенормин), ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (квинаприл) [3].

Обследовано 50 больных ИБС (22 мужчин и 28 женщин) в возрасте от 35 до 70 лет: у 30 из них зафиксирована стенокардия напряжения II-III ФК, у 11 – постинфарктный кардиосклероз, безболевого форма ишемии миокарда диагностирована у 7 пациентов, артериальная гипертензия имелась у 37 больных, дисциркуляторная энцефалопатия I-II ст. – у всех обследованных лиц, атерогенная дислипидемия выявлена у 39 больных.

Все пациенты произвольно были разделены на 5 групп:

1 группа больных (20 чел. – 12 мужчин и 8 женщин) получала Эйконол в суточной дозе 6-8 г в течение 6 месяцев, по требованию пациенты данной группы принимали нитроглицерин для купирования стенокардии и коринфар при гипертонических кризах.

2 группа больных (9 чел. – 7 муж. и 2 жен.) получала нитро-ник в суточной дозе 26-52 мг в течение 2 недель, по требованию применялся коринфар.

Больным 3 гр: (9 чел. – 1 муж. и 8 жен.) назначался ломир в суточной дозе 5-7,5 мг в течение 2 недель.

В 4 группе (6 чел. – 5 муж. и 1 жен.) больные принимали тенормин в суточной дозе 100-150 мг в течение 2 недель.

5 гр. (6 чел. – 3 муж. и 3 жен.) получала квинаприл в суточной дозе 10-20 мг в течение 2 недель.

После проведенной терапии у пациентов 1, 3, 4 групп, имевших ДЭ, отмечалось значительное улучшение состояния, а во многих случаях и исчезновение проявлений ДЭ. Во 2 и 5 группах проявления мозговой дисциркуляции сохранялись, а у пациентов, принимавших нитро-ник, усиливалась головная боль.

По результатам радиоизотопного исследования МК с Xe-133 при повторном обследовании было выявлено (при сопоставлении полученных данных с исходными по каждой группе), что в группе больных, принимавших нитро-ник, общий МК увеличился на 12% с усугублением мозаичности его на 14%, в группе, получавшей ломир, общий МК возрос на 1% со снижением мозаичности на 3%, в группе пациентов, принимавших тенормин, общий МК увеличился на 5%, в то время как мозаичность его уменьшилась на 4%, в группе, получавшей квинаприл, общий МК снизился на 11% и усугубилась его мозаичность на 12%, в группе больных, принимавших Эйконол, общий МК увеличился на 1% и выявлено значительное нивелирование мозаичности МК на 16% (рис. 1)



Рис. 1. Влияние ПНЖК ω-3 в составе Эйконола на мозаичность мозгового кровообращения пациентов (n=20) с ИБС в сопоставлении с действием лекарственных препаратов

Исходя из полученных результатов, можно сделать три вывода:

1. В происхождении дисциркуляторной энцефалопатии большое значение имеет мозаичность мозгового кровотока.
2. Прием Эйконола в суточной дозе 6-8 г в течение полугода способствует устранению мозаичности МК, что сопровождается улучшением состояния больных.
3. Гемодинамическая активность Эйконола не уступает таким активным сосудистым препаратам, как бета-блокатор тенормин и антагонист кальция ломир.

Литература

1. Ашмарин И.П., Исаев В.А., Самсонов М.А. Физиологические аспекты применения Эйконола и других ПНЖК ω -3 при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. Методические рекомендации. МГУ Биологический факультет. 1999. 21 с.
2. Исаев В.А. Эйконол и атеросклероз. М.: «МИР и СОГЛАСИЕ». 2008. 350 с.
3. Исаев В.А. Незаменимые факторы питания и физиологические аспекты их действия в организме человека. М.: «МИР и СОГЛАСИЕ». 2008. 247 с.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-143-146

DLINNOTSEPOCHECHNY FATTY ACIDS (EYKONOL) IN DIAGNOSTICS AND CORRECTION OF VIOLATIONS OF BRAIN BLOOD CIRCULATION AT DISTSIRKULYATORNY ENCEPHALOPATHIES

Isaev V.A., Simonenko S. V.

Scientific Research Institute of Baby Food - affiliate of Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology and Food Safety", Istra, Russia
48 Moskovskaya str., Istra, Moscow region, 143500
e-mail: info@niidp.ru

Research objective was assessment of influence of Eykonol on the cerebral blood flow (CBF) at ischemic heart disease patients in comparison with the most widespread cardiovascular drugs.

Key words: a variegation of a cerebral circulation, a xenon-133, Eykonol, an ischemic heart disease, distsirkulyatorny encephalopathy, Nitroglycerinum, Corinfarum, a nitro-nickname, lomir, tenormin, kvinaprit, a myocardium, stenocardia, PUFA Omega-3.

Numerous publications have shown that long-chain polyunsaturated fatty acids (Pufas) of the omega-3 class have a positive effect on blood circulation in patients with atherosclerosis [1,2].

In this regard, the aim of the study was to evaluate the effect of Eikonol on cerebral blood flow (CBF) in patients with IHD in comparison with the most common cardiovascular drugs. Such as prolonged forms of nitrates (nitro-NIC), calcium antagonists (lomir), beta-blockers (tenormin), angiotensin-converting enzyme inhibitors (quinapril) [3].

50 patients with coronary heart disease (22 men and 28 women) aged 35 to 70 years were examined: 30 of them had angina pectoris II-III FC, 11 had postinfarction cardiosclerosis, a painless form of myocardial ischemia was diagnosed in 7 patients, arterial hypertension was present in 37 patients, dyscirculatory encephalopathy I-II art. - in all the examined individuals, atherogenic dyslipidemia was detected in 39 patients.

All patients were randomly divided into 5 groups:

1 group of patients (20 people – 12 men and 8 women) received Eikonol in a daily dose of 6-8 g for 6 months, on request, patients in this group took nitroglycerin for the relief of angina and corinthar for hypertensive crises.

2 group of patients (9 people – 7 men and 2 women) received nitro-NIC in a daily dose of 26-52 mg for 2 weeks, corinthar was used on demand.

Patients 3 gr: (9 people – 1 men and 8 women) lomir was prescribed in a daily dose of 5-7. 5 mg for 2 weeks.

In group 4 (6 people – 5 men and 1 woman) patients took tenormin in a daily dose of 100-150 mg for 2 weeks.

5 gr. (6 people – 3 men and 3 women) received quinapril in a daily dose of 10-20 mg for 2 weeks.

After the treatment, patients of groups 1, 3, and 4 who had DE had a significant improvement in their condition, and in many cases, the disappearance of DE manifestations. In 2 and 5 groups of cerebral manifestations of discirculatory were preserved, and in patients taking nitro-nick, intensified headache.

The results of radioisotope investigations of CBF with Xe-133 upon repeated examination, it was revealed (the comparison data source for each group) that the group of patients treated with nitro-nick, shared CBF increased by 12% with the worsening of patchiness of about 14% in the group receiving lomir, total CBF increased by 1% with a decrease in patchiness by 3% in the group of patients taking tenormin, total CBF increased by 5%, while its mosaicity decreased by 4% in the group receiving quinapril, total CBF has decreased by 11% and worsened his mosaicism in 12%, in the group of patients, those who took Eikonol, the total CBF increased by 1% and revealed a significant leveling of the mosaic CBF by 16% (Fig. One)



Fig. 1. The effect of PUFA ω -3 in Eikonol on the mosaic of cerebral circulation in patients (n=20) with IHD in comparison with the effect of drugs

Based on the results obtained, three conclusions can be drawn:

1. In the origin of dyscirculatory encephalopathy, the mosaic of the cerebral blood flow is of great importance.
2. Taking Eikonol in a daily dose of 6-8 g for six months helps to eliminate the mosaic of CBF, which is accompanied by an improvement in the condition of patients.
3. The hemodynamic activity of Eikonol is not inferior to such active vascular drugs as the beta-blocker tenormin and the calcium antagonist lomir.

References

1. Ashmarin I.P., Isaev V.A., Samsonov M.A. *Fiziologicheskie aspekty primeneniya Eikonola i drugih PNZHK ω -3 pri zabolevaniyah serdechno-sosudistoy sistemy. Metodicheskie rekomendacii. MGU. Biologicheskij fakul'tet. 1999. 21 s.*
2. Isaev V.A. *Eikonol i ateroskleroz. M.: «MIR i SOGLASIE». 2008. 350 s.*
3. Isaev V.A. *Nezamenimye faktory pitaniya i fiziologicheskie aspekty ih dejstviya v organizme cheloveka. M.: «MIR i SOGLASIE». 2008. 247 s.*

УДК 57.013:612.1 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-146-148

ВИТАЛЬНАЯ МОРФОМЕТРИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ГОРМОНАМИ СТРЕССА

Иващенко М.Н.¹, Дерюгина А.В.², Игнатьев П.С.³, Метелин В.Б.⁴, Белов А.А.², Петров В.А.²

Нижний Новгород, Екатеринбург, Москва, Россия

¹ ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия» Министерства сельского хозяйства РФ, e-mail: marina.31@rambler.ru.

² Институт биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

³ Производственное объединение «Уральский оптико-механический завод им. Э.С. Яламова».

⁴ ФГБОУ ВО «Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина», ГБУЗ «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского».

Изучалась возможность применения лазерной интерференционной микроскопии для оценки морфологии эритроцитов в норме и при взаимодействии с гормонами стресса - кортизолом и адреналином. Установлено, что лазерная интерференционная микроскопия является важным инструментом, позволяющим получить информацию о физиологическом состоянии эритроцитов и организма в целом при экстремальных условиях. Определены, новые аспекты воздействия кортизола и адреналина на морфологию эритроцитов.

Ключевые слова: эритроциты, кортизол, адреналин, стресс, лазерная интерференционная микроскопия.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № №19-316-90066.

В настоящее время представление о внутриклеточной организации эритроцитов и их роли в организме существенно изменилось. Фокус интересов исследователей сместился от вопросов реологии, факторов лизиса эритроцитов к изучению особенностей молекулярной структуры их цитоплазматической мембраны, цитоскелета, механизмов функционирования метаболизма и способов управления ими. Это

позволяет не только понять на фундаментальном уровне уже известные закономерности, но и объяснить новые явления, связанные с функционированием эритроцитов.

Лазерная интерференционная микроскопия является инновационным методом изучения структуры и формы клеток. Преимуществом данной микроскопии можно считать получение информации о микро- и нано-архитектонике поверхности клетки, а также о структурах подмембранных слоев. С помощью данного метода, наряду с построением изображения образца, стало возможным измерять эластичность, шероховатость, ригидность поверхности и получать более полную информацию о состоянии эритрона по сравнению с традиционными лабораторными методами.

Целью наших исследований являлся анализ морфофункционального состояния эритроцитов при их взаимодействии с гормонами стресса — адреналином и кортизолом. Гормоны стресса участвуют в усилении энергетического обмена, адаптации организма к экстремальным условиям среды. Однако, малоизученными остаются механизмы их неспецифического действия, что особенно важно в условиях хронического стресса. Витальный анализ эритроцитов при их взаимодействии с гормонами осуществлялся методом лазерной интерференционной микроскопии на микроскопе МИМ-340 (Екатеринбург, Россия).

Проведенное исследование показало, что интактные эритроциты имели типичную форму двояковогнутых дискоцитов, мембрана имела ровную поверхность, внутриклеточные структуры были равномерно распределены. При введении во взвесь эритроцитов кортизола (5×10^{-7} г/мл) на поверхности клеточной мембраны появлялись домены с углублениями. При добавлении адреналина (1×10^{-9} г/мл), на поверхности клеточной мембраны наблюдались более значительные изменения, с образованием выпуклых доменов и спикул. В обоих случаях происходило значительное увеличение фазового диаметра и фазовой высоты клеток. У интактных эритроцитов фазовый диаметр составил $4,75 \pm 0,03$ мкм, фазовая высота - $256,8 \pm 4,66$ нм, при добавлении кортизола фазовый диаметр и фазовая высота увеличились на 7 и 22% соответственно, при добавлении адреналина фазовый диаметр и фазовая высота увеличились на 3 и 15% соответственно.

Учитывая, что регистрируемые изменения поверхности эритроцитов с использованием МИМ, опосредованы оптической плотностью клеточных структур, можно утверждать, что при однонаправленности морфометрических изменений при действии стресс-реализующих гормонов использование адреналина в отличие от кортизола приводит к образованию конгломератов в клетках с повреждением их функционирования. Таким образом, использование лазерной интерференционной микроскопии позволяет получить информацию о функциональном состоянии клеток, зависящим от фазы стресс-реакции, что может быть использовано для мониторинга и ранней диагностики стресса.

UDC 57.013:612.1 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-146-148

VITAL MORPHOMETRY OF RBC IN THEIR INTERACTION WITH STRESS HORMONES

Ivashchenko M.N.¹, Deryugina A.V.², Ignatiev P.S.⁴, Metelin V.B.³, Belov A.A.¹, Petrov V.A.¹

Nizhny Novgorod, Yekaterinburg, Moscow, Russia

¹ "Nizhny Novgorod state agricultural Academy" of the Ministry of agriculture, 603107, Nizhny Novgorod, Gagarin Ave., 97. e-mail: marina.31@rambler.ru.

² Institute of biology and Biomedicine Federal state Autonomous educational institution "National research Nizhny Novgorod state University Lobachevsky", 603950, Nizhny Novgorod, Gagarin Ave., 23.

³ Production Association "Ural optical and mechanical plant named After E.S. Yalamov".

⁴ Kosygin Russian state University, Moscow regional research clinical Institute named after M.F. Vladimirovsky.

The possibility to use the laser interference microscopy in order to assess the RBCs morphology in normal state and in interaction with cortisol and adrenalin as stress hormones was studied. It was established that the laser interference microscopy represented an important instrument permitting to receive the information about physiological state of the RBCs as well as of the organism in the whole in extreme condition. New aspects of cortisol and adrenalin impact on the RBC morphology are defined

Kew words: RBCs (erythrocytes), cortisol, adrenalin, stress, laser interference microscopy.

The research was done within the framework of Research №19-316-90066 of Russian Foundation of Basic Research.

At the present time the idea of intracellular organization of RBCs and their role in the body has considerably changed. The focus of interests of researchers has moved from the problems of rheology, erythrolysis factors

to the study of any particularities of cytoplasmic membrane molecular structure, of cytoskeleton as well as of metabolism functioning mechanisms and of the ways of their management. It permits not only to understand on the fundamental level the regularities which are already known but also to explain new discovered phenomena associated with the RBCs functioning.

The laser interference microscopy is an innovative method which permits to study the structure and the forms of cells. This method has any advantage because it permits to receive the information about mic- and nanoarchitectonics of the cell surface as well as about the structure of submembrane layers. Thanks to this method it's possible besides to the specimen imaging to measure elasticity, scabrities, and rigidity of the surface. In addition it permits to receive a more complete information about the state of erythron in comparison with that received by the traditional laboratory methods.

The research purpose was to analyze the morphofunctional state of RBCs in their interaction with the stress hormones: adrenalin and cortisol. The stress hormones take part in the reinforcement of the energy exchange, in the adaptation of the organism to extreme conditions of the environment. However, the mechanisms of their nonspecific action which are of grand importance in the situation of the chronic stress are still poorly studied. The vital analyzes of the RBCs in their interaction with the stress hormone was made by the method of the laser interference microscopy with MIM-340 microscope (Yekaterinburg, Russia).

The study showed that the intact RBCs had a typical form of biconcave discocytes, the membrane had a smooth surface, intracellular structures were equidistributed. When the cortisol was injected (5×10^{-7} g/ml) in the erythrocyte suspension the domains with deepenings appeared on the cell membrane surface. When the adrenalin was injected (1×10^{-9} g/ml) more considerable changes on the cell membrane surface were observed. The bulging domains and spicules appeared. The phase diameter and the phase altitude increased considerably in the both cases. The phase diameter of the intact RBC was $4,75 \pm 0,03$ mkm, their phase altitude was $256,8 \pm 4,66$ nm. When the cortisol was injected the phase diameter and the phase altitude increase by 7% and 22% respectively. When the adrenalin was injected the phase diameter and the phase altitude increase by 3% and 15% respectively.

Taking into account the fact that the changes of the RBC surface registered with use of MIM are influenced with the cell structure optical density it's possible to confirm that adrenalin unlike cortisol in unidirectional morphometric changes provokes the appearance of pellets in cells having damage in their functioning. So, the use of laser interference microscopy permits to receive the information about the functional state of cells depending on the stress reaction phase. It may be used for the monitoring and early diagnostics of the stress.

УДК 602.60.6 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-148-150

МОДИФИКАЦИЯ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ СОРБЦИОННО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ

Караваяева Л.И., Стучаева А.А., Глазова Н.В.

*Санкт-Петербургский Государственный Химико-Фармацевтический Университет,
Санкт-Петербург, Российская Федерация.
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14 Российская Федерация
e-mail: Lolita.Karavaeva@spcru.ru*

Проведена модификация гидролитических ферментов в целях повышения их стабилизации наноструктурами на основе β -циклодекстринов. Изучено влияние различных соотношений β -циклодекстринов на активность и стабильность ферментов. Изучены параметры сорбционно-хроматографического процесса процессы сорбции панкреатина на присутствии β -циклодекстринов.

Ключевые слова: поджелудочная железа, северный олень, панкреатин, сорбция, β -циклодекстрины.

Препараты панкреатина одни из самых востребованных на Российском рынке, но субстанция панкреатин в РФ не производится, поэтому заполнения российского рынка биологически активными добавками и лекарственными препаратами для лечения заболеваний ЖКТ осуществляется в основном зарубежными производителями. Поэтому технология получения субстанции отечественного панкреатина с использованием инновационных технологий является актуальной.

Объектами исследования являются: поджелудочные железы северного оленя (СО), модельные растворы

препаратов: Панкреатин (Sigma-Aldric, Germany), Амилазубтилин (ГЗХ ООО Сиббиофарм), Липоран 100L (Novozymes) и Протосубтилин ГЗХ (ООО Сиббиофарм, Россия).

Известно, что в поджелудочной железе СО протеазы находятся в активной форме, в отличии от протеаз, содержащихся в поджелудочной железе КРС [1]. В связи с этим при разработки сорбционно – хроматографического метода возникла необходимость защиты ферментов, выделяемых совместно с протеазами от возможности их расщепления самой протеазой. Поэтому для предотвращения разрушения ферментов на стадии выделения и очистки гидролитических ферментов была проведена стабилизация этих ферментов β -циклодекстринами. Изучение динамического процесса сорбции и десорбции панкреатических ферментов проводили на выбранных сорбентах из растворов ферментных препаратов. В ходе эксперимента выявлено оптимальное соотношение фермента и β -циклодекстринов, а также время их взаимодействия: для α -амилазы – соотношение 1:4 при времени выдержки 60 минут, для липазы – 1:4 при времени выдержки 45 минут, для протеазы – 1:2 при времени выдержки 30 минут. Далее была изучена сорбция ферментов из модельного раствора панкреатина на выбранных сорбентах Purolite-C150 и Purolite-C115EC в присутствии β -циклодекстринов. [1] По полученным экспериментальным данным были построены выходные кривые и были рассчитаны выходы сорбции по активности.

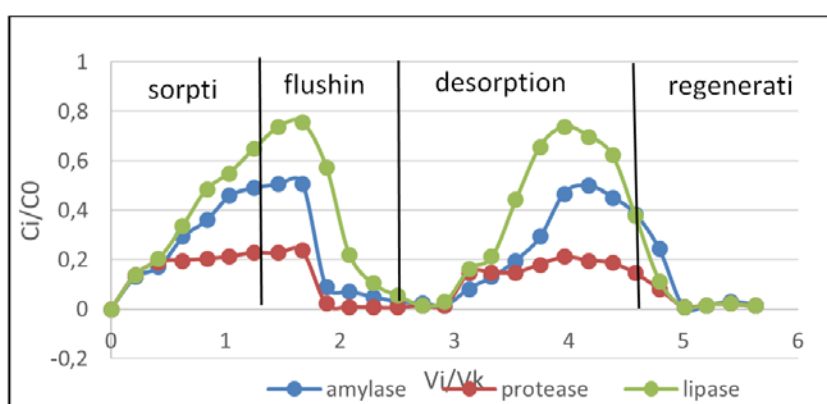


Рис.1 Выходная кривая сорбции и десорбции панкреатина на сорбенте Purolite-C115 EC

Из рис. 1 видно, что активность при десорбции ферментов сохраняется (выходы: протеаза - 92 %, амилаза - 89 %, липаза – 95%).

Выводы: Экспериментальные данные показали, что наиболее эффективным сорбентом для сорбционного выделения панкреатина является Purolite-C115 EC.

Литература

1. Караваева Л.И. Разработка сорбционного метода выделения и очистки комплекса гидролитических ферментов из поджелудочной железы северного оленя/Караваева Л.И., Стучаева А.А., Глазова Н.В.// Сборник материалов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации», Санкт-Петербург, 07-08 ноября, СПб. 2019. – С. 204 – 208.

UDC 602.60.6 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-148-150

MODIFICATION OF HYDROLYTIC ENZYMES FROM NORTHERN DEER PANCARRIA WITH THE PURPOSE OF DEVELOPMENT OF THE SORPTION-CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR ISOLATION AND CLEANING

Karavaeva L.I., Stuchaeva A.A., Glazova N.V.

Saint-Petersburg State University of Chemical and Pharmaceuticals,
 Saint-Petersburg, Russian Federation. 197376, St. Petersburg, ul. prof. Popova, d. 14 Russian Federation
 e-mail: Lolita.Karavaeva@spcpcu.ru

The modification of hydrolytic enzymes was carried out in order to increase their stabilization by nanostructures based on β -cyclodextrins. The effect of various ratios of β -cyclodextrins on the activity and stability of enzymes was studied. The parameters of the sorption-chromatographic process of sorption of pancreatic in the presence of β -cyclodextrins were studied.

Key words: pancreas, reindeer, pancreatic, sorption, b-cyclodextrins.

Pancreatic preparations are one of the most popular on the Russian market, but the substance pancreatic is not produced in the Russian Federation, therefore, filling the Russian market with biologically active additives and drugs for the treatment of gastrointestinal diseases is carried out mainly by foreign manufacturers. Therefore, the technology of obtaining the substance of domestic pancreatic using innovative technologies is relevant.

The objects of study are: reindeer pancreas (CO), model solutions of preparations: Pancreatin (Sigma-Aldric, Germany), Amilosubtilin (G3X Sibbiofarm LLC), Lipopan 100L (Novozymes) and Protosubtilin G3X (Sibbiofarm LLC, Russia).

It is known that in the pancreas CO the prostheses are in active form, in contrast to the proteases contained in the pancreas of cattle [1]. In this regard, when developing the sorption - chromatographic method, there was a need to protect enzymes secreted together with proteases from the possibility of their splitting the protease itself. Therefore, to prevent the destruction of enzymes at the stage of isolation and purification of hydrolytic enzymes. The dynamic process of sorption and desorption of pancreatic enzymes was studied on selected sorbents from solutions of enzyme preparations. During the experiment, the optimal ratio of the enzyme and b-cyclodextrins was found, as well as their interaction time: for α -amylase, the ratio was 1: 4 with a holding time of 60 minutes, for lipase – 1: 4 with an exposure time of 45 minutes, for protease – 1: 2 with an exposure time of 30 minutes. Next, sorption of enzymes from a pancreatic model solution on selected Purolite-C150 and Purolite-C115EC sorbents in the presence of β -cyclodextrins was studied. [1] Based on the obtained experimental data, output curves were constructed and the sorption yields were calculated by activity.

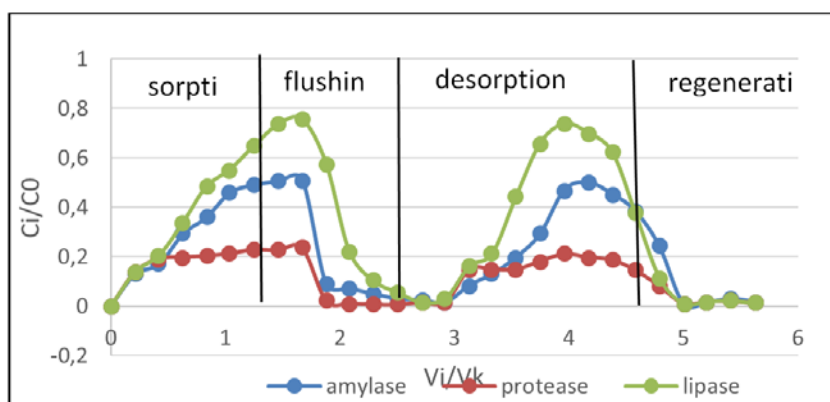


Fig. 1 The output curve of sorption and desorption of pancreatic on the sorbent Purolite-C115 EC

From fig. Figure 1 shows that the activity during the desorption of enzymes is preserved (yields: protease – 92%, amylase – 89%, lipase – 95%).

Conclusions: Experimental data showed that Purolite-C115 EC is the most effective sorbent for sorption of pancreatic.

References

1. Karavaeva LI Development of a sorption method for the isolation and purification of a complex of hydrolytic enzymes from the reindeer pancreas / Karavaeva L.I., Stuchaeva A.A., Glazova N.V. // Collection of materials of the VII All-Russian scientific and practical conference with international participation "Innovations in health of the nation", St. Petersburg, November 07–08, St. Petersburg. – 2019. – С. 204 - 208.

УДК: 577.112.6 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-151-152

ПЕПТИДНЫЕ ПОЛЯ НА ПОЛИАНИЛИНЕ: ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ В ИЗУЧЕНИИ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПРОТЕАЗ

А.В. Колесниченко, Н.А. Казьмина, Р.Г. Вахренев, М.В. Мельникова, Е.Ф. Колесанова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича", Россия, 119121, Москва, Погодинская, 10, 89295762099
e-mail: alenka.aks@mail.ru

Разработан метод получения пептидил-полианилинов (пептидил-ПАНИ), полученные вещества охарактеризованы. Исследовано влияние условий полимеризации на структуру и свойства пептидил-ПАНИ. Показана возможность использования пептидных полей из пептидил-ПАНИ в изучении субстратной специфичности протеаз.

Ключевые слова: пептидные поля, пептидил-ПАНИ, полимеризация, трипсин, химо tripsин

Пептидные поля – закрепленные на подложке пептиды, используемые для определения продуктов реакции связывания, модификации или гидролиза этих пептидов непосредственно на подложке или в отобранной с подложки аликвоты реакционной смеси. Пептиды связывают с подложкой путём синтеза прямо на ней либо путём ковалентного или сорбционного взаимодействия готовых пептидов с активированной подложкой [1,2]. Иным способом закрепления на подложке может быть получение пептид-содержащих полимеров из пептидов, модифицированных мономерами, полимеризующимися в мягких условиях.

Нами были впервые получены модифицированные пептидными остатками полианилины (пептидил-ПАНИ) для использования в качестве пептидных полей. Мономеры – *p*-аминоанилиды (рАА) пептидов Glu-Leu-Arg-Ser-Gly-Ser-Gly, потенциального субстрата трипсина и химо tripsина, и Ac-Tyr-Arg-Ser-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Gly-Ser, содержащего способный к окислению остаток Tyr, получали твердофазным синтезом на смоле с привитым остатком *p*-фенилендиамина [3]. Окислительную полимеризацию в различных соотношениях пептид-рАА:анилин проводили химическим и ферментативным способами с использованием K₂Cr₂O₇ и пероксидазы хрена, соответственно, с применением в качестве подложек полистирольных планшетов и волокон шерсти. Структуру и свойства пептидил-полимеров изучали масс-спектрометрическим анализом, спектрофотометрией в УФ-, видимой и ИК-областях и аминокислотным анализом. Гидролиз пептида под действием трипсина и химо tripsина детектировали по появлению в растворе отщепляемых фрагментов, взаимодействующих с *o*-фталевым альдегидом.

Подтверждена способность пептидил-рАА образовывать пептидил-ПАНИ под действием как химической, так и ферментативной окислительной полимеризации, но химическая протекала более эффективно и с образованием более высокомолекулярных продуктов. С уменьшением отношения пептид-рАА:анилин увеличивалась длина полимерных цепочек и наблюдалось образование нерастворимого в воде полимера; в отсутствие анилина образовывались олигомеры. Аминокислотный анализ нерастворимого полимера подтвердил наличие в нем остатков пептида. В условиях полимеризации не происходило окисления остатка Tyr в пептиде. Нерастворимый пептидил-ПАНИ, полученный при соотношениях пептид-рАА:анилин 1:50-1:100, адсорбировался на полистирольных планшетах. На волокнах шерсти адсорбции пептидил-ПАНИ не отмечено, в отличие от адсорбции ПАНИ без пептидных остатков. С помощью гидролиза Glu-Leu-Arg-Ser-Gly-Ser-Gly-ПАНИ трипсином и химо tripsином было определено оптимальное соотношение пептид-рАА и анилина при полимеризации для создания оптимальной структуры пептидил-ПАНИ в качестве пептидного поля. Гидролиз пептидил-ПАНИ трипсином и химо tripsином показал доступность пептидного фрагмента полимера для связывания в активном центре фермента и последующего расщепления.

Финансирование: Пептиды синтезированы с использованием оборудования ЦКП «Протеом человека» ИБМХ. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг.

Литература

1. Moshkovskii S.A, Kolesanova E.F, Archakov A.I. Continuous B-epitope maps of cytochrome P450cam (CYP101) obtained by peptide scanning: correlation to spatial structure//Arch Biochem Biophys. 2002. Vol. 398(2). P. 269-274.

2. Кузьмина Т.И. и др. Антигенность и В-эпитопное картирование оболочечного белка E2 вируса гепатита С// Биомед. Химия. – 2009. – Т.55. – С.32-40.
3. Чистов А.А. и др. Усовершенствованный способ получения низкомолекулярных субстратов тромбина – п-нитроанилидов пептидов//Biomedical Chemistry: Research and Methods. – 2018. – №1(4). – e00057.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-151-152

POLYANILINE-BASED PEPTIDE ARRAYS: PRODUCTION, PROPERTIES AND APPLICATION IN STUDIES OF SUBSTRATE SPECIFICITY OF PROTEASES

A. Kolesnichenko, N. Kaz'mina, R. Vakhrenev, M. Melnikova, E. Kolesanova

Institute of Biomedical Chemistry, Russia, 119121, Moscow, Pogodinskaya, 10

Method for peptidyl-polyaniline (peptidyl-PANI) preparation was developed, and obtained substances were characterized. Influence of polymerization conditions on the peptidyl-PANI structure and properties was studied. A potential use of peptidyl-PANI peptide arrays in protease substrate specificity investigations was demonstrated.

Key words: peptide arrays, peptidyl-PANI, polymerization, trypsin, chymotrypsin

Peptide arrays represent peptides attached to a surface and used for the determination of binding, modification, or hydrolysis products of these peptides directly on the surface or in an aliquot of the reaction mixture. Peptides are attached to the surface either via direct synthesis on it or by covalent or adsorptive interactions of already prepared peptides with activated surface [1,2]. Another possible way of peptide fixation on the surface is the preparation of peptide-containing polymers from peptides modified with monomers, which polymerize under mild conditions.

We prepared polyanilines modified with peptide moieties (peptidyl-PANI) for use as peptide arrays for the first time. Monomers, p-aminoanilides (pAA) of peptides Glu-Leu-Arg-Ser-Gly-Ser-Gly, a potential substrate of trypsin and chymotrypsin, and Ac-Tyr-Arg-Ser-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Ser-Gly-Ser, containing an oxidizable Tyr residue, were obtained by solid-phase synthesis on a resin with attached p-phenylenediamine residue [3]. Chemical and enzymatic oxidative polymerization (with K₂Cr₂O₇ and horseradish peroxidase, respectively) in various peptide-pAA: aniline ratios was carried out on polystyrene plates and wool fibers as substrates. Peptidyl polymer structures and properties were studied by mass-spectrometric analysis, UV-Vis and IR spectrophotometry and amino acid analysis. Hydrolysis of the peptide under the trypsin and chymotrypsin action was detected via appearance of the cleaved fragment that interacts with o-phthalaldehyde, in the solution.

We confirmed the ability of peptidyl-pAA to form peptidyl-PANI via both chemical and enzymatic oxidative polymerization, however the chemical polymerization proceeded more efficiently, and resulted in higher molecular weight product formation. While the peptide-pAA: aniline ratio decreased, the polymer chain length increased and a water-insoluble polymer formation was observed; in the absence of aniline, only oligomers were formed. Amino acid analysis confirmed the presence of peptide moieties in this insoluble polymer. Under, No Tyr residue oxidation took place in the peptide under the polymerization conditions. The insoluble peptidyl-PANI obtained at peptide-pAA: aniline ratios of 1:50-1:100 adsorbed onto polystyrene plates. No peptidyl-PANI adsorption was observed on wool fibers, in contrast to free PANI adsorption on this surface. While performing tryptic and chemotryptic hydrolysis of Glu-Leu-Arg-Ser-Gly-Ser-Gly-PANI, the peptide-pAA-to-aniline optimal ratio was determined for the polymerization in order to form an optimal peptidyl-PANI structure for the use as a peptide array. Hydrolysis of peptidyl-PANI with trypsin and chymotrypsin showed the peptide fragment accessibility in the polymer for binding in the enzyme active center and the subsequent cleavage.

Grant: Peptides were synthesized on the IBMC Core Facility «Human proteome» equipment. The work was carried out in the framework of the Program for basic scientific research of State Academies of sciences for 2013-2020.

References

1. Moshkovskii S.A, Kolesanova E.F, Archakov A.I. Continuous B-epitope maps of cytochrome P450cam (CYP101) obtained by peptide scanning: correlation to spatial structure. Arch Biochem Biophys. 2002. Vol. 398 (2). P. 269-274.
2. Kuzmina T.I. et al. Antigenicity and B-epitope mapping of hepatitis C virus E2 envelope protein. – Biomed. Chemistry. – 2009. – Vol. 55. – P. 32-40.
3. Chistov A.A. et al. An improved method for producing low molecular weight substrates of thrombin – peptide p-nitroanilides. – Biomedical Chemistry: Research and Methods. – 2018. – №1(4). – e00057.

УДК 615.456 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-153-154

УПРАВЛЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ ЛИПИДНОГО НАНОКОНТЕЙНЕРА ДЛЯ ДОСТАВКИ ФТОРХИНОЛОНОВ

Колмогоров И.М., Якимов И.Д., Ле-Дейген И.М., Скурядина А.А., Кудряшова Е.В.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, кафедра химической энзимологии, Москва, Россия

119192, Москва, ул. Ленинские Горы, 1, стр 11Б

e-mail: kolmogorov2001@mail.ru

Для управления физико-химическими свойствами липосомальных наноконтейнеров для доставки фторхинолонов применено два подхода: вариация липидного состава липосом (нейтральные и анионные) и способа включения антибактериального препарата (активная и пассивная загрузка), и подбор функционализирующего полимера на основе производных хитозан-манноза. Установлено, что включение в состав липосом анионного фосфолипида кардиолипина приводит к повышению эффективности загрузки на 5-20%. Изучен механизм встраивания лекарств в мембраны, определены основные сайты связывания. Функционализация липосомальной поверхности осуществлена производными хитозан-маннозы различной молекулярной массы, потенциально обеспечивающие адресную доставку в альвеолярные макрофаги.

Ключевые слова: липосомы, фторхинолоны, системы доставки лекарств, хитозан

На сегодняшний день как в России, так и в мире остро стоит вопрос борьбы с инфекционными заболеваниями, в том числе с туберкулёзом. Перспективной группой антибактериальных препаратов являются фторхинолоны (ФХ), однако их невысокая биодоступность в целевых тканях до сих пор ограничивает применимость в терапии. Перспективной является стратегия включения ФХ в липосомальные везикулы, функционализированные полимерами. Целью настоящей работы является поиск путей управления физико-химическими свойствами липосомальных форм фторхинолонов путем вариации липидного состава везикул и подбора функционализирующего полимера на основе производных хитозана для придания системам большей стабильности и эффекта активного нацеливания.

Получали липосомальные формы ФХ методом пассивной и активной (градиент сульфата аммония) загрузки. Эффективность загрузки была большей для моксифлоксацина (до 90%), по сравнению с левофлоксацином, по-видимому, за счёт его большей липофильности, при этом применение градиента сульфата аммония позволило повысить эффективность загрузки на 10 – 20%. Присутствие анионного фосфолипида кардиолипина повышает эффективность включения на 5-20% в зависимости от условий загрузки. Для уточнения сайтов связывания активных молекул с липосомами применен метод ИК-спектроскопии Фурье. Для всех образцов липосомальных форм препаратов в области поглощения карбонильной и фосфатной группы наблюдаются высокочастотные сдвиги и усложнение структуры полосы, характерные для образования водородных связей, причем эти сдвиги более выражены для липосом, полученных методом активной загрузки.

Для комплексов липосомальных форм ДПФХ 100% с производными хитозана наблюдается слабое взаимодействие полимеров с фосфатными группами, о чем свидетельствуют лишь незначительные изменения в области поглощения асимметричных валентных колебаний фосфатной группы в спектр липосом. При этом образование комплекса подтверждается увеличением среднего гидродинамического радиуса везикул, в зависимости от молекулярной массы полимера на 10 – 25 нм.

Несколько иная картина наблюдается для липосом, содержащих кардиолипин. Взаимодействие с полимерами носит поверхностный характер, вызывая расщепление полосы поглощения фосфатной группы. Обнаруживаемые высокочастотные компоненты (1245 и 1260 см⁻¹) характерны для низкогидратированных фосфатных групп, связанных с катионными лигандами, при этом гидродинамический радиус увеличивается значительно (на 20-30 нм).

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-153-154

CONTROL OF PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF A LIPID NANOCONTAINER FOR DELIVERY OF DRUGS WITH LOW BIOAVAILABILITY

Kolmogorov I.M., Yakimov I.D., Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Kudryashova E. V.

Lomonosov Moscow state University, Department of chemical Enzymology, Moscow, Russia
 119192, Moscow, Leninskie Gory str., 1, page 11 B
 e-mail: kolmogorov2001@mail.ru

We have used two ways to control the physicochemical properties of liposomal nanocontainers for the delivery of fluoroquinolones: variation of the lipid composition of liposomes and selection of a functionalizing polymer based on chitosan mannose derivatives. The presence of anionic phospholipid cardiolipin in the liposome composition increases the loading efficiency by 5-20%. The mechanism of drug incorporation into membranes was studied, and the main binding sites were determined. The functionalization of the liposomal surface was carried out by chitosan mannose derivatives of various molecular weights, potentially providing targeted delivery to alveolar macrophages.

Key words: liposomes, fluoroquinolones, drug delivery systems, chitosan

Today, both in Russia and in the world, the issue of combating infectious diseases, including tuberculosis, is an acute issue. A promising group of antibacterial drugs are fluoroquinolones (FQ), but their low bioavailability in target tissues still limits its applicability in therapy. A promising strategy is the incorporation of FQ into liposomal vesicles functionalized by polymers. The aim of this work is to find ways to control the physicochemical properties of liposomal forms of FQ by varying the lipid composition of vesicles and selecting a functionalizing polymer based on chitosan derivatives to give systems higher stability and an active targeting effect.

We have obtained liposomal forms of FQ by the method of passive and active (gradient of ammonium sulfate) loading. The loading efficiency was higher for moxifloxacin (up to 90%), compared with levofloxacin, apparently due to its greater lipophilicity, while the use of a gradient of ammonium sulfate allowed to increase the loading efficiency by 10 - 20%. The presence of anionic cardiolipin increases the efficiency of inclusion by 5-20% depending on loading conditions. To clarify the binding sites of active molecules with liposomes, Fourier transform IR spectroscopy was used. For all samples of FQ liposomal forms, in the absorption region of the carbonyl and phosphate groups, high-frequency shifts and a complication of the band structure characteristic of the formation of hydrogen bonds are observed, and these shifts are more pronounced for liposomes obtained by the active loading method.

For complexes of liposome forms of DPPC 100% with chitosan derivatives, a weak interaction of polymers with phosphate groups is observed, as evidenced by only slight changes in the absorption region of asymmetric stretching vibrations of the phosphate group in the liposome spectrum. Moreover, the formation of the complex is confirmed by an increase in the average hydrodynamic radius of the vesicles, depending on the molecular weight of the polymer by 10 - 25 nm.

Different pattern is observed for liposomes containing cardiolipin. Interaction with polymers is superficial, causing the splitting of the absorption band of the phosphate group. The detected high-frequency components (1245 and 1260 cm^{-1}) are characteristic of low-hydrated phosphate groups bound to cationic ligands, while the hydrodynamic radius increases significantly (by 20-30 nm).

УДК 577.353.9 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-154-156

ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛЬНЫХ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЖИВЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ИОН-ПРОВОДЯЩЕЙ МИКРОСКОПИИ

Колмогоров В.С., Ванеев А.Н., Савин Н.А., Яковлев А.П., Алова А.В., Лаврушкина С.В., Ерофеев А.С., Горелкин П.В., Киреев И.И., Мажуга А.Г., Корчев Ю.Е., Новак П., Клячко Н.Л.

Химический факультет Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия.
 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3
 Национальный Исследовательский Технологический Университет «МИСиС», Москва Россия.
 119049, Москва, Ленинский проспект 4
 e-mail: vasilii.kolmogorov@chemistry.msu.ru

Измерены механические свойства опухолевых клеток РС-3 рака предстательной железы человека до и после воздействия веществ, действующих на актиновый цитоскелет, микротрубочки и клеточное ядро,

методом сканирующей ион-проводящей микроскопии. Обнаружены изменения локальных механических свойств, соответствующие механизмам действия данных веществ.

Ключевые слова: сканирующая-зондовая микроскопия, сканирующая ион-проводящая микроскопия, клеточная биология, цитостатики, механические свойства живых клеток, элементы цитоскелета

Сканирующая ион-проводящая микроскопия (SICM) - это новый метод сканирующей зондовой микроскопии с наноразмерным боковым и вертикальным разрешением, который позволяет обеспечить неинвазивное исследование *in vitro* отдельной клетки в условиях приближенных к физиологическим. За счет небольшого давления, возникающего за счет межмолекулярных сил отталкивания между клеточной мембраной и острием нанопипетки можно обеспечить бесконтактное измерение жесткости с помощью SICM. Жесткость может быть измерена локально на разных участках клетки, из-за малого размера острия нанопипетки, в отличие от ACM, где используются большие сферические зонды.

В данной работе измерена жесткость клеток PC3 рака предстательной железы человека и HT1080 человеческой фибросаркомы под действием паклитаксела и монометил ауристатина для стабилизации и деполимеризации микротрубочек соответственно, а также цитохалазина-д для деполимеризации актиновых филаментов. Результаты работы показали значительную разницу в значениях жесткости в случае измерения в области ядра и периферии клетки в обеих клеточных линиях. Измеренная жесткость после обработки паклитакселом показывает значительное повышение жесткости в области над ядром и в области периферии, тогда как обработка монометил ауристатином приводила к обратному эффекту. Аналогичное падение жесткости наблюдалось после воздействия цитохалазина-д для обеих клеточных линий.

Эксперименты с GFP-прогеринном были проведены в гетерогенной популяции HT1080 с контрольными и GFP-прогеринновыми клетками. Контрольное измерение жесткости показывает $\sim 1,7$ кПа и $\sim 0,7$ кПа, когда клетки, обработанные GFP-прогеринном, увеличивали значение только в области над ядром (~ 2 кПа).

Как мы видим, измерение жесткости на основе SICM показывает различные эффекты паклитаксела, монометил ауристатина, цитохалазина-д и прогерина на компартменты раковых клеток, включая актин, микротубулин и мембрану ядра, соответственно.

Работа частично поддержана проектом Российского Научного Фонда № 19-79- 30062, темой с гос регистрацией АААА-А16-116052010081-5 и Программой развития МГУ.

577.353.9 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-154-156

STUDYING THE LOCAL MECHANICAL PROPERTIES OF LIVING CELLS VIA SCANNING ION-CONDUCTING MICROSCOPY

Kolmogorov V.S., Vaneev A.N., Savin N.A., Yakovlev A.P., Alova A.V., Lavrushkina S.V., Erofeev A.S., Gorelkin P.V., Kireev I.I., Majouga A.G., Korchev Y.E., Novak P., Klyachko N.L.

Lomonosov Moscow State University, School of Chemistry, Moscow, Russia
119991, Moscow, GSP-1, 1-3 Leninskiye Gory
National University of Science and Technology "MISIS", Moscow, Russia
119049, Moscow, Leninsky prospect 4
e-mail: vasillii.kolmogorov@chemistry.msu.ru

The mechanical properties of PC-3 tumor cells of human prostate cancer before and after exposure to substances acting on the actin cytoskeleton, microtubules, and cell nucleus were measured by scanning ion-conducting microscopy. Changes in local mechanical properties corresponding to the mechanisms of action of these substances were found

Key words: scanning probe microscopy, scanning ion-conducting microscopy, cell biology, cytostatics, mechanical properties of living cells, elements of the cytoskeleton

Single cell stiffness measurement via Scanning Ion-conductance Microscopy (SICM) is a novel method of studying cell mechanical properties. The work principle of SICM is to allow the topography mapping with lateral and vertical nanoscale resolution. Also, it is possible to provide simultaneous stiffness mapping due to applying low stress on cell surface whose nature is intrinsic colloidal pressure between a nanopipette tip and cell membrane. Nanoscale diameter of the nanopipette tip allows obtaining the cell stiffness distribution on different parts of a single cell.

We report the cell stiffness measurement of drug-induced alterations in cancer cell compartments studied by SICM. Specifically, we have measured fibrosarcoma cells (HT1080) transfected with Progerin, which can integrate in protein structure of nucleus membrane. Progerin was modified with GFP fluorescence dye (GFP-Progerin). Also, we provided the stiffness measurement on PC3 cells and HT1080 human fibrosarcoma exposed to paclitaxel and monomethyl auristatin for stabilization and depolymerization of microtubules, respectively, as well as cytochalasin-d for depolymerization of actin filaments.

Experiments with GFP-Progerin were provided in heterogeneous population of HT1080 with a control and GFP-Progerin transfected cells. The control cell stiffness measurement shows 1.7 kPa and 0.7 kPa , when GFP-Progerin treated cells increased value only on nucleus area. In control and treated PC3 and HT1080 cells we measured cell stiffness above the nucleus and cytoplasm area showing two different values in control cells. Measured stiffness after Paclitaxel treatment shows significantly increased stiffness value on nucleus and cytoplasm area, whereas monomethyl auristatin shows reverse effect for both cell lines, as well as after cytochalasin-d treatment.

As we can see, SICM-base measurement of stiffness shows different effects of Paclitaxel, Monomethyl auristatin, Cytochalasin-D and Progerin on cancer cell compartments, including actin, microtubulin and nucleus membrane, respectively. Drug-induced disruptions of these cell compartments lead to the cell mechanical properties alteration depending on inhibition mechanism.

The work was supported in part by Russian Science Foundation grant (SICM supported by project No. 19-79-30062), State Topic AAAA-A16-116052010081-5, MSU Program of Development.

УДК 615.014.23 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-156-158

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ЭФИРОВ АСТАКСАНТИНА И ПОЛУЧЕНИЕ НАНОЭМУЛЬСИЙ НА ИХ ОСНОВЕ

Куликова И.С., Лотош Н.Ю., Туранова В.А., Селищева А.А.

НИЦ «Курчатовский Институт», Москва, Россия
 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1
 e-mail: kef-irka08@mail.ru

Методом ВЭЖХ установлен жирнокислотный состав моноэфиров астаксантина, выделенных из экстракта микроводоросли *Haematococcus pluvialis*. Методом инъекции получены наноэмульсии смеси моно- и диэфиров на основе фосфатидилхолина, стабилизированные альбумином. Определены размеры частиц наноэмульсий, дзета-потенциал и индекс полидисперсности.

Ключевые слова: астаксантин, моно- и диэфиры астаксантина, жирнокислотный состав, метод ВЭЖХ, наноэмульсии на основе фосфатидилхолина, размер частиц.

Каротиноид астаксантин (АСТ) синтезируется в клетках микроводоросли *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) при воздействии стресса (избыточного освещения, повышенного содержания солей) в основном в виде моно- и диэфиров. В последние годы к этому соединению проявляется повышенный интерес, потому что АСТ показал различную потенциальную биологическую активность *in vitro* и *in vivo*. В первую очередь речь идет об антиоксидантной активности, которая превышает активность витаминов С, Е и β -каротина [1]. Поскольку АСТ плохо растворим в воде и разрушается на свету, задача данной работы состояла в разработке стабильной водорастворимой формы эфиров АСТ, оценке их стабильности и физико-химических характеристик.

Из экстракта микроводоросли *H. pluvialis* выделены АСТ и фракции моно- и диэфиров АСТ методом колоночной хроматографии. Установлен жирнокислотный состав моноэфиров АСТ методом ВЭЖХ. На первом этапе исследований изучена стабильность водных растворов эфиров и моноэфиров АСТ, содержащих 5% этанола. В качестве стабилизаторов использовали антиоксиданты: альбумин, ионол (10^{-4} M) и аскорбиновую кислоту (10^{-4} M). Соотношение активного вещества и альбумина варьировали от 1:1 до 1:10. Стабильность определялась спектрофотометрически. У образцов моноэфиров АСТ, содержащих альбумин (1:5) и ионола, оптическая плотность снизилась на 87% на 25 сутки, в то время как у аналогичного образца смеси эфиров АСТ оптическая плотность снизилась на 41%.

Далее методом инъекции получили разные наноэмульсии на основе соевого фосфатидилхолина (4 мг/мл), содержащие смесь эфиров АСТ (0,25 мг/мл). Одна из эмульсий была стабилизирована добавлением альбумина (1:5), а другая содержала альбумин (1:5) и ионол одновременно [2]. Размер частиц, индекс полидисперсности (ИП) и дзета-потенциал были измерены методом динамического светорассеяния.

Наноэмульсии получились гомогенными (ИП < 0,3) с частицами размером 40–70 нм. Эмульсия смеси эфиров АСТ, содержащая альбумин, но без ионола, оказалась наиболее устойчивой, т.к. падение оптической плотности на 35 сутки составило только 8 % (рис. 1) При хранении тех же самых образцов в темноте и при температуре +4°C оптическая плотность эмульсии с альбумином снизилась на 3%.

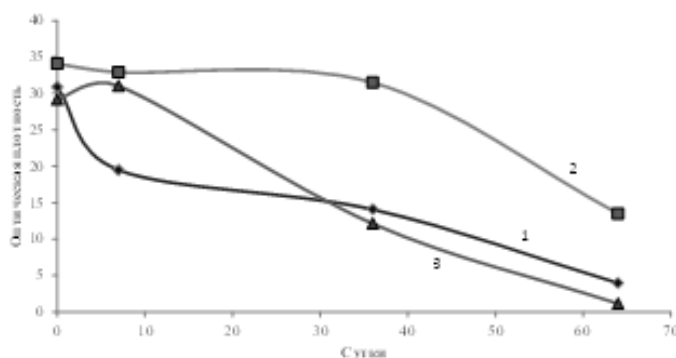


Рис.1. Изменение оптической плотности эмульсий при хранении на свету при комнатной температуре в течение 2-х месяцев

Согласно полученным результатам, наиболее стабильной оказалась водорастворимая форма эфиров АСТ в виде наноэмульсии, стабилизированная добавлением альбумина.

Источник финансирования: Научно-исследовательская работа, Приказ № 1363 от 25 июня 2019 г. НИЦ «Курчатовский институт».

Литература

1. Naguib Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2000. – Vol. 48. – №. 4. – P. 1150-1154.
2. Gentine P. et al. Manufacture of liposomes by isopropanol injection: characterization of the method // *Journal of liposome research*. – 2012. – Vol. 22. – №. 1. – P. 18-30.

UDC 615.014.23 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-156-158

DETERMINATION OF THE FATTY ACID COMPOSITION OF ASTAXANTIN ESTERS AND OBTAINING NANOEMULSIONS ON THEIR BASIS

Kulikova I.S., Lotosh N.Y., Turanova V.A., Selischeva A.A.

National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia,
123182, Moscow, Academician Kurchatov Square 1
e-mail: kef-irka08@mail.ru

Fatty acid composition of astaxanthin monoesters isolated from the microalgae extract *Haematococcus pluvialis* was determined by HPLC. Nanoemulsions of astaxanthin esters with phosphatidylcholine and albumin were obtained. The particle sizes in the nanoemulsions, zeta potential and the polydispersity index were determined.

Key words: astaxanthin, mono- and diesters of astaxanthin, fatty acid composition, HPLC, nanoemulsions with phosphatidylcholine, particle sizes.

Carotenoid astaxanthin (AST) is synthesized in the microalga *Haematococcus pluvialis* (*H.pluvialis*) during stress (excessive lighting, high salt content) mainly in the two form – mono- and diesters. In recent years, AST has attracted scientists due to its *in vitro* and *in vivo* different potential biological activity. First this is about antioxidant activity, which exceeds the activity of vitamins C, E and β -carotene [1]. The purpose of this work was the development of stable water-soluble form of AST esters, estimate their stability and physico-chemical characteristics because AST is hydrophobic molecule and destroyed in the light.

AST and its esters were isolated from microalgae extract *H. pluvialis* by column chromatography. The fatty acid composition of astaxanthin monoesters was determined by HPLC. First of all the stability of AST esters and monoesters aqueous solutions containing 5% ethanol was studied. Albumin, ionol (10^{-4} M) and ascorbic acid

(10^{-4} M) were used as antioxidants stabilizers. The ratio of active substance and albumin ranged from 1:1 to 1:10. Stability was determined spectrophotometrically. The optical density of AST monoesters samples containing albumin (1:5) and ionol decreased by 87% on day 25, while in similar samples of AST esters it decreased by 41%.

Further some nanoemulsions with phosphatidylcholine (4 mg/ml) and AST esters (0.25 mg/ml) were obtained by injection. One of the emulsions was stabilized by the addition of albumin (1:5), and the other contained albumin (1:5) and ionol simultaneously [2]. The particle sizes in the nanoemulsions, zeta potential and the polydispersity index (PI) were determined by dynamic light scattering. The nanoemulsions were homogeneous (PI <0.3) with particles 40–70 nm in size. The emulsion of AST esters containing only albumin was the most stable because the decrease of optical density on day 35 was 8% (Fig. 1). However during storage these samples in the dark and at a temperature of +4°C the optical density of the emulsion with albumin decreased by 3%.

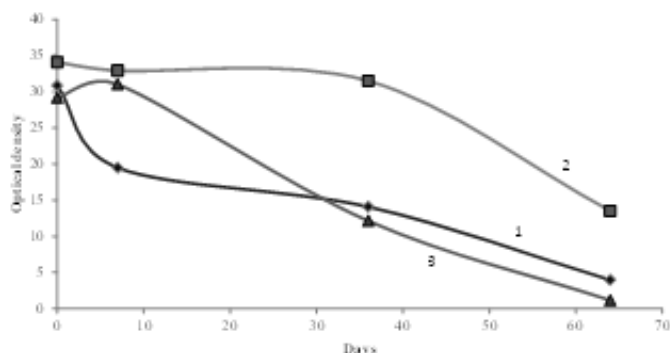


Fig. 1. Change of the emulsions optical density during storage in the light at room temperature for 2 months

According to the results, the most stable water-soluble AST esters form was nanoemulsion, stabilized by the addition of albumin.

Source of funding: Research work, Order No. 1363 of June 25, 2019, Research Center Kurchatov Institute.

References

1. Naguib Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2000. – Vol. 48. – №. 4. – P. 1150-1154.
2. Gentine P. et al. Manufacture of liposomes by isopropanol injection: characterization of the method // *Journal of liposome research*. – 2012. – Vol. 22. – №. 1. – P. 18-30.

УДК 615.015.11 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-158-160

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ АФФИННОСТИ КОНЪЮГАТОВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ НА АСИАЛОГЛИКОПРОТЕИновый РЕЦЕПТОР ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ

Лопухов А.В.¹, Петров Р.А.¹, Ямансаров Э.Ю.¹, Биневский П.В.¹, Мажуга А.Г.^{1,2,3}, Клячко Н.Л.¹

¹ Химический факультет Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Российский Химико-Технологический Университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

³ Национальный исследовательский технологический университет «Московский Институт Стали и Сплавов», Москва, Россия

119991, Москва, ул. Ленинские горы, 1-11Б, кафедра химической энзимологии, к.203

e-mail: day.of.detox@gmail.com

Получены конъюгаты паклитаксела и бетулина с N-ацетилгалактозаминном, их аффинность к асиалогликопротеиновому рецептору исследована методом спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса. Определены термодинамические константы диссоциации (K_D). Определено влияние структурных элементов линкера на связывание с рецептором.

Ключевые слова: асиалогликопротеиновый рецептор, спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса, направленная доставка лекарств.

Гепатоцеллюлярная карцинома является третьей по распространенности причиной смертности от рака, на которую приходится более 90% случаев первичного рака печени в мире. Асиалогликопротеиновый рецептор (ASGPR) представляет собой лектин С-типа (Ca^{2+} -зависимый), который активно экспрессируется на поверхности паренхимальных клеток печени. Считается, что основная физиологическая роль ASGPR заключается в связывании, интернализации и последующем удалении из циркуляции гликопротеинов с концевыми остатками галактозы и N-ацетилгалактозамина. Расположение и функция делают рецептор идеальной мишенью для доставки терапевтических агентов в клетки печени.

Низкомолекулярные соединения обычно распространяются в организме системно. Такой путь часто связан с необходимостью вводить высокие терапевтические дозы, и может вызывать значительную побочную токсичность. Молекулы паклитаксела и бетулина были модифицированы для адресной доставки в гепатоциты.

Были синтезированы ковалентные конъюгаты низкомолекулярных соединений и N-ацетил-D-галактозамина (GalNAc), и их аффинность к ASGPR была исследована с использованием метода спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Оба конъюгата продемонстрировали высокую аффинность со значениями KD в наномолярном диапазоне ($0,5 \pm 0,1$ нМ и $1,5 \pm 0,2$ нМ для конъюгатов паклитаксел-GalNAc и бетулин-GalNAc, соответственно), что значительно превышает аффинность нативных лигандов ASGPR - GalNAc и галактозы. Исследован ряд конъюгатов с различными структурами линкера. Показано, что присутствие фрагмента N-ацетил-D-галактозамина рядом с треазольным кольцом в структуре линкера оказывает синергетическое действие на связывание с ASGPR. Высокая аффинность является ключевой характеристикой для использования асиалогликопротеинового рецептора при доставке лекарств.

Работа была частично поддержана грантом РФФ 20-64-46029, темой с гос регистрацией AAA-A-16-116052010081-5 и Программой развития МГУ.

UDC 615.015.11 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-158-160

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT COMPOUNDS CONJUGATES FOR ASGPR-TARGETED DRUG DELIVERY

Lopukhov A.V.¹, Petrov R.A.¹, Yamansarov E.Yu.¹, Binevski P.V.¹, Majouga A.G.^{1,2,3}, Klyachko N.L.¹

¹ Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

² D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation

³ National University of Science and Technology MISIS, Moscow, Russian Federation
119991, Moscow, 1-11B Leninskiye Gory, Chemical Enzymology Department, #203
e-mail: day.of.detox@gmail.com

The conjugates of paclitaxel and betulin with N-acetylgalactosamine were obtained, their affinity to the asialoglycoprotein receptor was evaluated via surface plasmon resonance spectroscopy technique. Thermodynamic dissociation constants (K_D) were determined. The influence of the structural elements of the linker on the binding of the receptor was studied.

Key words: asialoglycoprotein receptor, surface plasmon resonance spectroscopy, targeted drug delivery

The third most common cause of cancer mortality is hepatocellular carcinoma, accounting for more than 90% of global cases of primary liver cancer. The asialoglycoprotein receptor (ASGPR) is a C-type (Ca^{2+} -dependent) lectin which is highly expressed on the surface of liver parenchymal cells. The primary physiological role of ASGPR has been considered to be binding, internalization, and subsequent clearance from the circulation of galactose- and N-acetylgalactosamine-terminated glycoproteins. The location and the function make the receptor an ideal target for delivery of therapeutic agents to liver cells.

The low molecular weight compounds are usually subject of systemic delivery. Often this route is associated with high therapeutic dose and significant side toxicity. Molecules of paclitaxel and betulin were modified for targeted delivery in hepatocytes.

Covalent conjugates of low molecular weight compounds and N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) were synthesized and their affinities to ASGPR has been assessed using surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy technique. Both conjugates exhibited strong binding affinity with KD values in the nanomolar range (0.5 ± 0.1 нМ and 1.5 ± 0.2 нМ for paclitaxel-GalNAc and betulin-GalNAc conjugates, respectively), that considerably exceed the affinities of native ASGPR ligands – GalNAc and galactose. The number of conjugates with different linker structure were studied. Obtained results confirmed that the presence of the N-acetyl-D-galactosamine moiety near

the treazole in the structure of the linker conjugate has a synergic effect on binding to ASGPR. The high affinity is the key characteristic for selective ASGPR-mediated drug delivery.

The work was supported in part by RSF 20-64-46029 grant, State Topic AAAA-A16-116052010081-5 and MSU Program of Development.

УДК 577.3 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-160-163

РАЗРАБОТКА НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОЧАСТИЦ С РАДАХЛОРИНОМ В КАЧЕСТВЕ КОМПЛЕКСНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Мирошкина А.М.^{1*}, Кречетов С.П.², Яковцева М.Н.², Бабёнышев А.В.², Краснюк И.И.¹

¹ ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Россия, 119991, г. Москва, Никитский бул., д. 13

² МФТИ, Россия, 141700, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., д. 9

* e-mail: asyamir@mail.ru

По методу множественной эмульсии получены полимерные биосовместимые микрочастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот с включением магнитных наночастиц, перфтордекалина и радахлорина, как действующего вещества. Показано, что полученные микрочастицы обладают достаточным включением радахлорина для генерации синглетного кислорода и проявления фотосенсибилизационного эффекта при воздействии светового излучения, используемого при фотодинамической терапии.

Ключевые слова: микрочастицы, радахлорин, магнитные наночастицы, перфтордекалин, фотодинамическая терапия, опухолевые клетки.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – перспективный метод в лечении онкологических заболеваний, в основе которого лежит способность предварительно введенных в организм фотосенсибилизаторов (ФС) генерировать синглетный кислород под воздействием лазерного облучения с определенной длиной волны [1]. Одновременно с синтезом новых ФС и разработкой новых источников светового облучения, которые значительно увеличили клиническую эффективность фотодинамической терапии [2], ведутся работы по созданию систем доставки ФС на основе микро- и наночастиц [3]. Привлекательность использования микрочастиц (МЧ) обосновывается не только их способностью, в ряде случаев, селективно накапливаться в опухоли [4], но так же способствует преодолению лекарственной устойчивости опухолей [5] и позволяет создать в опухоли депо ФС при местном введении [6] или трансартериальной эмболизации. [7] Радахлорин (РХ) является ФС второго поколения и содержит до 90% натриевых солей хлорина е6 [8]. Наличие выраженного максимума (662нм) в красной области спектра поглощения и высокого квантового выхода образования синглетного кислорода при поглощении света в этой области [9], обеспечивают высокую фототоксичность этого препарата *in vivo* и *in vitro* [10] и объясняет его широкое использование в качестве ФС при ФДТ.

Целью данного исследования было получение содержащих РХ наноструктурированных полимерных МЧ на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (СМГК) с включением магнитных наночастиц (МНЧ) и перфтордекалина (ПФД) для использования при ФДТ.

Материалы и методы. Для приготовления МЧ был использован метод множественной дисперсии твердое в масле в воде (Т/М/В). Первичную дисперсию Т/М получали диспергированием лиофильно высушенного раствора РХ в растворе СМГК и лецитина в хлористом метиле. Полученную первичную дисперсию затем эмульгировали во вторичной водной дисперсионной среде (водный раствор 1% поливинилового спирта и 0,5% метилцеллюлозы). Созревание полученных МЧ происходило в течение 20 часов при комнатной температуре. Частицы отмывали дистиллированной водой, после чего высушивали под вакуумом. При включения в МЧ стабилизированные олеиновой кислотой МНЧ и ПФД добавляли в первичную дисперсионную среду. По данным сканирующей электронной микроскопии были оценены морфологические характеристики и размеры МЧ. Образование синглетного кислорода определяли спектрофотометрически по его реакции с дифенилбензофураном (ДФБФ) в условиях облучения светом красного светоизлучающего диода (СИД) с максимумом 650 нм. Высвобождение РХ из МЧ оценивали флуориметрически. Поглощение клетками и цитотоксичность МЧ анализировали с помощью оптической и конфокальной микроскопии и МТТ-теста на клеточных опухолевых линиях.

Результаты и обсуждения. Полученные МЧ, согласно данным сканирующей электронной микроскопии имеют размер до десяти микрон (< 10 мкм) и склонны к образованию агломератов. При включении

в полимерную матрицу МНЧ, полученные МЧ имеют неправильную форму, а при включении ПФД – нефлуоресцирующие зоны. На спектрах поглощения МЧ присутствуют характерные для радахлорина пики: длинноволновый в районе 660 нм и коротковолновый в районе 400 нм, что указывает на сохранение инкапсулированным РХ оптических свойств. Регистрируемая способность МЧ к генерации синглетного кислорода при облучении суспензии МЧ светом красного СИД с излучением в области длинноволновой полосы поглощения РХ, указывает на возможность использования МЧ в качестве терапевтического агента для ФДТ. Постепенное длительное (не менее двух недель) высвобождение РХ из МЧ предполагает возможность их использование в качестве депо при местном введении в опухоль или артериальной эмболизации проблемной области. Полученная пролонгированная форма является преимуществом по отношению к свободному, неинкапсулированному РХ, период полувыведения из организма которого составляет сутки (около 94%) [11]. По результатам МТТ-теста в присутствии полученных МЧ с инкапсулированным РХ было выявлено значительное угнетение жизнедеятельности клеток при облучении СИД по сравнению с необлученными клетками, что указывает на возможность использования таких МЧ для ФДТ. Включение в полимерную матрицу МЧ МНЧ и ПФД позволяет рассматривать их в качестве комплексной тераностической системы доставки ФС, предполагающей дополнительную возможность использования МРТ для наблюдения за поступлением МЧ в опухоль и распределением МЧ в организме.

Выводы. С помощью метода множественной эмульсии Т/М/В из биосовместимого полимера СМГК были получены МЧ с включением РХ, достаточным для проявления эффекта фотоцитотоксичности. Пролонгированное высвобождение РХ из МЧ и включение в полимерную матрицу МНЧ и ПФД позволяет рассматривать такие МЧ в качестве тераностических агентов типа депо для ФДТ при местном введении в опухоль или артериальной эмболизации проблемной области.

Литература

1. Филоненко Е.В, Серова Л.Г. Фотодинамическая терапия в клинической практике // *Biomedical Photonics*. - 2016. - Т. 5 - №2. - С. 26-37.
2. Ron R Allison, Gordon H Downie, Rosa Cuenca, Xin-Hua Hu, Carter JH Childs, Claudio H Sibata. Photosensitizers in clinical PDT // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* – 2004. - №1. – P. 27-42
3. Li T., Yan L. Functional polymer nanocarriers for photodynamic therapy // *Pharmaceuticals*. – 2018. – V. 11. – №. 4. – P. 133(1-23)
4. Zhou L, Wang H, Li Y. Stimuli-responsive nanomedicines for overcoming cancer multidrug resistance // *Theranostics*. – 2018. – V. 8. - №. 4.- P. 1059-1074
5. Kalyane D, Raval, N, Maheshwari R, Tambe V, Kalia K, Tekade R.K. Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer // *Mater Sci Eng.*- 2019. - №. 98. – P. 1252-1276
6. Shah SR, Kim J, Schiapparelli P, et al. Verteporfin-Loaded Polymeric Microparticles for Intratumoral Treatment of Brain Cancer // *Mol Pharm.* – 2019. – V. 16. - №. 4. – P. 1433-1443
7. Li X, Yu H, Huang Y, et al. Preparation of microspheres encapsulating sorafenib and catalase and their application in rabbit VX2 liver tumor // *Biomed Pharmacother.* – 2020. – P. 129.
8. Privalov VA, Lappa AV, Kochneva EV. Five years experience of photodynamic therapy with new chlorin photosensitizer // *Proc SPIE*. – 2005. – P. 5863.
9. Vargas F., Díaz Y., Yartsev V., Marcano A., Lappa A. Photophysical properties of novel PDT photosensitizer Radachlorin in different media // *Ciencia*. – 2004. - №. 12. – P. 70-77
10. Douillard S., Olivier D., Patrice T. *In vitro* and *in vivo* evaluation of Radachlorin® sensitizer for photodynamic therapy // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2009. - №. 8. – P. 405-413
11. Вакуловская Е. Г., Решетников А. В., Залевский И. Д., Кемов Ю. В. Фотодинамическая терапия и флуоресцентная диагностика с фотосенсибилизатором радахлорин у больных раком кожи // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2004. – Т. 3. – №. 1. – С. 77–82.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-160-163

DEVELOPMENT OF NANOSTRUCTURED POLYMERIC MICROPARTICLES WITH RADACHLORINE AS A COMPLEX DELIVERY SYSTEM FOR PHOTODYNAMIC THERAPY

Miroshkina A.M.^{1*}, Krechetov S.P.², Yakovcheva M.N.², Babenechev A.V.², Krasnyk I.I.¹

¹ First Moscow State Medical University (Sechenov university), Russia, 119991, Moscow, Nikitskuy bulvar, 13

² Moscow Institute of Physics and Technology (MIPT), Russia, 141700, Moscow region, Dolgoprudny, Institutskuy street, 9

* e-mail: asyamir@mail.ru

Polymeric biocompatible microparticles based on a copolymer of lactic and glycolic acids with the inclusion of magnetic nanoparticles, perfluorodecalin and radachlorin as an active substance were obtained by the method of multiple emulsion. It has been shown that the obtained microparticles have a sufficient inclusion of radachlorin to generate singlet oxygen and manifest a photocytotoxic effect when exposed to light radiation used in photodynamic therapy.

Key words: microparticles, radachlorin, magnetic nanoparticles, perfluorodecalin, photodynamic therapy, tumor cells.

Photodynamic therapy (PDT) is a promising method in the treatment of oncological diseases, which is based on the ability of preliminarily introduced photosensitizers (PS) to generate singlet oxygen under the influence of laser irradiation with a certain wavelength [1]. Simultaneously with the synthesis of new PSs and the development of new sources of light irradiation, which significantly increased the clinical efficiency of photodynamic therapy [2], work is underway to create systems for the delivery of PSs based on micro- and nanoparticles [3]. The attractiveness of using microparticles (MPs) is justified not only by their ability, in some cases, to selectively accumulate in the tumor [4], but it also helps to overcome the drug resistance of tumors [5] and allows you to create a depot PS in the tumor with local administration [6] or transarterial embolization [7]. Radachlorin (RC) is the second-generation PS, which contains up to 90% sodium salts of chlorin e6 [8]. The presence of a pronounced maximum (662 nm) in the red region of the absorption spectrum and a high quantum yield of singlet oxygen formation upon absorption of light in this region [9] ensure the high phototoxicity of this drug *in vivo* and *in vitro* [10], and it also explains its widespread use as a PS in PDT.

The aim of this study was to obtain nanostructured polymer MPs, which are based on a copolymer of lactic and glycolic acids (PLGA) and contain RC as a PS, with the inclusion of magnetic nanoparticles (MNPs) and perfluorodecalin (PFD) for use in PDT.

Materials and methods. The method of multiple dispersion of solid in oil in water (S/O/W) was used to prepare MPs. The primary dispersion of S/O was obtained by dispersing a lyophilized solution of RC into the solution of PLGA and lecithin in methylene chloride. The obtained primary dispersion was then emulsified in a secondary aqueous dispersion medium (aqueous solution of 1% polyvinyl alcohol and 0.5% methylcellulose). The resulting MPs matured for 20 hours at room temperature. The particles were washed with distilled water and then dried under vacuum. Upon inclusion in MPs stabilized with oleic acid MNPs and PFD were added to the primary dispersion medium. According to the data of scanning electron microscopy, the morphological characteristics and sizes of MPs were estimated. The formation of singlet oxygen was determined spectrophotometrically by its reaction with diphenylbenzofuran (DPBF) under conditions of irradiation with light from a red light-emitting diode (LED) with a maximum of 650 nm. The release of RC from MPs was assessed fluorometrically. Cell uptake and cytotoxicity of MPs were analyzed using optical and confocal microscopy and MTT test on tumor cell lines.

Results and discussion. The obtained MPs, according to the data of scanning electron microscopy, have a size of up to ten microns (<10 μm) and are prone to the formation of agglomerates. When MNPs are included in the polymer matrix, the resulting MPs have an irregular shape, and when PFD are included, the MPs have non-fluorescent zones. The absorption spectra of MPs contain peaks characteristic of RC: long-wavelength at 660 nm and short-wavelength at 400 nm, which indicates that the encapsulated RC retains its optical properties. The ability of MPs to generate singlet oxygen when a suspension of MPs is irradiated with red LED light emitting in the region of the long-wavelength absorption band of RC indicates the possibility of using MPs as a therapeutic agent for PDT. Gradual long-term (at least two weeks) release of RC from MP suggests the possibility of their use as a depot for local injection into a tumor or arterial embolization of the problem area. The obtained prolonged form is an advantage over free, non-encapsulated RC, the half-life of which is a day (about 94%) [11]. According to the results of the MTT test, in the presence of the obtained MPs with encapsulated RC, significant inhibition of the vital activity of cells under irradiation with LED was revealed in comparison with non-irradiated cells, which indicates the

possibility of using such MPs for PDT. The inclusion of MNPs and PFD into the polymer matrix makes it possible to consider them as a complex theranostic system of PS delivery, which suggests an additional possibility of using MRI to monitor the entry of MPs into the tumor and the distribution of MPs in the body.

Conclusions. Using the method of multiple emulsion S/O/W, MPs were obtained from the biocompatible polymer PLGA with the inclusion of RC sufficient for the manifestation of the effect of photocytotoxicity. Prolonged-release of RC from MPs and incorporation of MNPs and PFD into the polymer matrix allows such MPs to be considered as depot-type theranostic agents for PDT when administered locally into a tumor or arterial embolization of a problem area.

References

1. Filonenko E.V., Serova L.G. Photodynamic therapy in clinical practice // *Biomedical Photonics*. - 2016. – V. 5. - №. 2. - P. 26–37.
2. Ron R Allison, Gordon H Downie, Rosa Cuenca, Xin-Hua Hu, Carter JH Childs, Claudio H Sibata. Photosensitizers in clinical PDT // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* – 2004. - №1. – P. 27-42
3. Li T., Yan L. Functional polymer nanocarriers for photodynamic therapy // *Pharmaceuticals*. – 2018. – V. 11. – №. 4. – P. 133(1-23)
4. Zhou L, Wang H, Li Y. Stimuli-responsive nanomedicines for overcoming cancer multidrug resistance // *Theranostics*. – 2018. – V. 8. - №. 4. - P. 1059-1074
5. Kalyane D, Raval, N, Maheshwari R, Tambe V, Kalia K, Tekade R.K. Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer // *Mater Sci Eng.* - 2019. - №. 98. – P. 1252-1276
6. Shah SR, Kim J, Schiapparelli P, et al. Verteporfin-Loaded Polymeric Microparticles for Intratumoral Treatment of Brain Cancer // *Mol Pharm.* – 2019. – V. 16. - №. 4. – P. 1433-1443
7. Li X, Yu H, Huang Y, et al. Preparation of microspheres encapsulating sorafenib and catalase and their application in rabbit VX2 liver tumor // *Biomed Pharmacother.* – 2020. – P. 129.
8. Privalov VA, Lappa AV, Kochneva EV. Five years experience of photodynamic therapy with new chlorin photosensitizer // *Proc SPIE*. – 2005. – P. 5863.
9. Vargas F., Díaz Y., Yartsev V., Marcano A., Lappa A. Photophysical properties of novel PDT photosensitizer Radachlorin in different media // *Ciencia*. – 2004. - №. 12. – P. 70-77
10. Douillard S., Olivier D., Patrice T. *In vitro* and *in vivo* evaluation of Radachlorin® sensitizer for photodynamic therapy // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2009. - №. 8. – P. 405-413
11. Vakulovskaya E.G., Reshetnikov A.V., Zalevsky I.D., Kemov Yu.V. Photodynamic therapy and fluorescence diagnostics with the photosensitizer radachlorin in patients with skin cancer // *Russian Biotherapeutic Journal*. – 2004. – V. 3. – №. 1. – P 77–82

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-163-165

РАЗРАБОТКА МЕТОДА СКРИННИНГА АУТОАНТИТЕЛ К NMDA-РЕЦЕПТОРАМ ПРИ ПЕРВЫХ ЭПИЗОДАХ ШИЗОФРЕНИИ И ДРУГИХ РАССТРОЙСТВ ПСИХОТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

Павлова О.В., Мурашко А.А., Павлов К.А., Гурина О.И. Шмуклер А.Б..

ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России, Москва, Россия
119034, г. Москва, Кропоткинский пер., д. 23
e-mail: uovnew@mail.ru

Для раннего выявления и успешного лечения NMDA-рецепторного энцефалита необходимо разработать удобную в использовании и надежную тест-систему. Кроме того, важно выделять NMDA-рецепторный энцефалит из различных симптоматически похожих психических заболеваний. Надежным критерием является обнаружение антител к NMDA-рецепторам в сыворотке крови и ликворе пациентов.

Ключевые слова: энцефалит, NMDA-рецепторы, антитела, тест-система.

Об этиологии нервно-психических расстройств известно очень мало. Одним из основных патологических процессов, протекающих при различных видах острых и хронических заболеваний ЦНС, является глутамат-опосредованная эксайтотоксичность. Глутамат – это основной возбуждающий нейротрансмиттер в ЦНС. В последние годы стало ясно, что не только избыток глутамата может вызвать массивное повреждение головного мозга. В сыворотке крови и ликворе пациентов с различными психическими и невровоспалительными заболеваниями были обнаружены несколько типов анти-глутамат-рецепторных антител, которые, несомненно, могут также приводить к гибели нейронов и нарушениям их функций, индуцируя

различные патологические процессы в ЦНС. Обнаружение аутоантител, связывающихся с NMDA-рецепторами и вызывающих неврологические и психиатрические симптомы, привело к возникновению гипотезы о том, что в основе некоторых случаев психических расстройств могут лежать аутоиммунные процессы. Таким образом, перспективным направлением является разработка лабораторного метода для дифференциальной диагностики при первичных психозах.

Для решения этой задачи нами был выбран метод «cell-based assay». Сыворотки крови пациентов исследовали на наличие антител к NMDA-рецептору с помощью первичных культур нейронов гиппокампа, т.к. эта структура содержит наибольшее число нейронов, экспрессирующих NMDA-рецепторов.

Учитывая высокую межвидовую гомологию NMDAR1, в своей работе в качестве культур мы использовали первичные культуры нейронов крысы, полученные по протоколу, описанному в статье Nunez J (1).

Образцы сывороток были получены от 50 пациентов, поступивших на лечение в остром психотическом состоянии с расстройствами шизофренического спектра (F2x по МКБ-10) или аффективными психозами (F30.2, F32.3 по МКБ-10).

Первичные культуры на 7 - 10 день культивирования были охарактеризованы иммуноцитофлуориметрическим методом на маркеры MAP2, NMDR1 и NSE (2,3). Процентное количество нейронов в культуре составило 95%.

При достижении 80-90% монослоя первичные культуры нейронов гиппокампа крысы фиксировали 100% ледяным метанолом, промывали и инкубировали в течение ночи с образцами сыворотки пациентов объемом 200мкл. После 5ти кратной промывки DPBS вносили вторичные козы антитела к IgG, IgM, IgA (H+L) человека, конъюгированные с биотином. После 3х кратной промывки культуры инкубировали с раствором стрептавидина, конъюгированного с Alexa 455. Для визуализации нейронспецифической енолазы использовали анти-NSE кроличьи антитела и козы антитела к IgG кролика, конъюгированные с Alexa555.

Анализ интенсивности и локализации специфической флуоресценции осуществляли на конфокальном микроскопе Nikon Eclipse.

В результате нами было выявлено достоверное специфическое окрашивание NMDA-рецепторов (NR1) в 2 из 50 представленных образцов. Таким образом, предложенный методический подход может быть использован для дифференциальной диагностики пациентов, поступивших на лечение в остром психотическом состоянии с расстройствами шизофренического спектра (F2x по МКБ-10) или аффективными психозами (F30.2, F32.3 по МКБ-10).

Литература

1. Nunez J. (2008). *Primary Culture of Hippocampal Neurons from P0 Newborn Rats. JoVE. 19, doi: 10.3791/895*
2. Pathmanandavel, K., Starling, J., Merheb, V., Ramanathan, S., Sinmaz, N., Dale, R. C., & Brilot, F. (2015). *Antibodies to Surface Dopamine-2 Receptor and N-Methyl-D-Aspartate Receptor in the First Episode of Acute Psychosis in Children. Biol Psychiatry. 2015 Mar 15;77(6):537-47. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.07.014.*
3. Arbolea, S., Clemente, A., Deng, S., Bedmar, M., Salvador, I., Herbera, P., Julià, M. R. (2016). *Anti-NMDAR antibodies in new-onset psychosis. Positive results in an HIV-infected patient. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.011*
4. Pavlov K.A., Gurina O.I., Antonova O.M., Semenova A.V., Chekhonin V.P. (2011) *Cloning and expression of human neuron-specific enolase cDNA in Escherichia coli. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2011. T. 152. № 2. 206-209.*

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-163-165

DEVELOPMENT OF A CELL-BASED ASSAY METHOD FOR SCREENING AUTOANTIBODIES TO NMDA-RECEPTORS IN THE FIRST EPISODES OF SCHIZOPHRENIA AND OTHER MENTAL DISORDERS

Pavlova O.V., Murashko A.A., Pavlov K.A., Gurina O.I., Shmukler A.B.

*Federal State Budgetary Institution «V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology» of the Ministry of Health of the Russian Federation (V. Serbsky NMRCPN), Moscow, Russia
 119034, Moscow, Kropotkinskiy per., 23
 e-mail: uovnew@mail.ru*

For the early detection and successful treatment of NMDA receptor encephalitis, an easy-to-use and reliable test system must be developed. In addition, it is important to isolate NMDA-receptor encephalitis from various symptomatically similar mental illnesses. A reliable criterion is the detection of antibodies to NMDA receptors in the blood serum and CSF of patients.

Key words: encephalitis, NMDA receptors, antibodies, test system.

Little is known about the etiology of neuropsychiatric disorders. One of the main pathological mechanisms that occurs in various types of acute and chronic central nervous system diseases is glutamate-mediated excitotoxicity. Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the central nervous system. Recently, it has become evident that not only glutamate excess can cause massive brain damage. Several types of anti-glutamate receptor antibodies were found in serum and cerebrospinal fluid of patients with various mental and neuroinflammatory disorders. These antibodies can lead to the death of neurons and impaired neuronal function inducing various pathological mechanisms in the central nervous system. The discovery of autoantibodies that bind to NMDA receptors and cause neurological and psychiatric symptoms has led to the hypothesis that autoimmune mechanisms may underlie some cases of mental disorders. Thus, a promising direction is the development of a laboratory method for differential diagnosis in primary psychoses.

To solve this problem, we have chosen the "cell-based assay" method. The blood sera of patients were examined for the presence of antibodies to the NMDA receptor using primary cultures of hippocampal neurons, since this structure contains the largest number of neurons expressing NMDA receptors.

Taking into account the high interspecies homology of NMDAR1, in our work we used primary cultures of rat neurons obtained according to the protocol described in the article by Nunez J (1).

Serum samples were obtained from 50 patients admitted for treatment in an acute psychotic state with schizophrenic spectrum disorders (F2x according to ICD-10) or affective psychoses (F30.2, F32.3 according to ICD-10).

Primary cultures on days 7-10 of cultivation were characterized by immunofluorescence method for markers MAP2, NMDR1 and NSE (2, 3, 4). The percentage of neurons in the culture was 95%.

When 80-90% monolayer was reached, primary cultures of rat hippocampal neurons were fixed with 100% ice-cold methanol, washed and incubated overnight with patient serum samples of 200 μ L. After 5-fold washing with DPBS, secondary goat antibodies to human IgG, IgM, IgA (H + L) conjugated with biotin were added. After 3 times washing, the cultures were incubated with a solution of streptavidin conjugated to Alexa 455. Anti-NSE rabbit antibodies and goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa555 were used to visualize neuron-specific enolase.

Analysis of the intensity and localization of specific fluorescence was carried out using a Nikon Eclipse confocal microscope.

As a result, we revealed a significant specific staining of NMDA receptors (NR1) in 2 out of 50 presented samples. Thus, the proposed methodological approach can be used for differential diagnosis of patients admitted for treatment in an acute psychotic state with schizophrenic spectrum disorders (F2x according to ICD-10) or affective psychoses (F30.2, F32.3 according to ICD-10).

References

1. Nunez J. (2008). Primary Culture of Hippocampal Neurons from P0 Newborn Rats. *JoVE*. 19, doi: 10.3791/895
2. Pathmanandavel, K., Starling, J., Merheb, V., Ramanathan, S., Sinmaz, N., Dale, R. C., & Brilot, F. (2015). Antibodies to Surface Dopamine-2 Receptor and N-Methyl-D-Aspartate Receptor in the First Episode of Acute Psychosis in Children. *Biol Psychiatry*. 2015 Mar 15;77(6):537-47. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.07.014.
3. Arboleya, S., Clemente, A., Deng, S., Bedmar, M., Salvador, I., Herbera, P., Julià, M. R. (2016). Anti-NMDAR antibodies in new-onset psychosis. Positive results in an HIV-infected patient. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.011>
4. Pavlov K.A., Gurina O.I., Antonova O.M., Semenova A.V., Chekhonin V.P. (2011) Cloning and expression of human neuron-specific enolase cDNA in *Escherichia coli*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011. T. 152. № 2. 206-209.

УДК 547.415.5, 547.426.253, 544.77.051.62, 57.083.37 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-165-167

МИЦЕЛЛООБРАЗОВАНИЕ И ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ СИММЕТРИЧНЫХ ЛИПОФИЛЬНЫХ ПОЛИАМИНОВ

Перевощикова К.А., Щеглова Е.А., Макарова Д.М., Пучков П.А., Шмендель Е.В., Маслов М.А.

Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия
119571, пр-т Вернадского, 86
e-mail: perevoshikova@mirea.ru

Получены симметричные производные липофильных полиаминов, образующие мицеллы. Наименьшие значения ККМ наблюдались для производных на основе норспермина. Оценка цитотоксичности симметричных липофильных полиаминов указала на увеличение значений IC50 по сравнению с их несимметричными аналогами.

Ключевые слова: полиамины, диглицериды, мицеллы, цитотоксичность

Природный полиамин спермин и его предшественники являются необходимыми для роста эукариотических клеток. Внутриклеточная концентрация полиаминов (ПА) строго регулируется процессами биосинтеза, транспорта и катаболизма. Известно, что повышенный внутриклеточный уровень ПА связан развитием онкологических или других гиперпролиферативных заболеваний.

Симметрично или несимметрично замещенные производные природных и синтетических полиаминов обладают значительным противоопухолевым действием. Ранее нами были разработаны несимметричные производные липофильных полиаминов, которые обладали высокой цитотоксичностью в отношении различных раковых клеток [1].

В данной работе были разработаны симметричные производные липофильных полиаминов на основе норспермина и триэтилентетрамина (ТЭТА). В качестве липофильных доменов выступали диглицериды, отличающиеся длиной углеводородной цепи. Синтезированные соединения оказались плохо растворимы в воде, однако они образуют мицеллы в микромолярном диапазоне концентраций. Было обнаружено, что увеличение длины углеводородной цепи (C_{10} - C_{18}) в диглицеридном остатке приводит к снижению критической концентрации мицеллообразования (ККМ). Минимальные значения ККМ были установлены для полиаминов на основе норспермина.

Для мицеллярного водного раствора производного триэтилентетрамина, содержащего октадецильный заместитель была проведена оценка цитотоксичности в отношении клеток аденокарциномы толстой кишки (HCT116). Результаты показали, что значения IC_{50} были в 4 раза больше, чем для его несимметричного аналога.

Работа поддержана Минобрнауки Российской Федерации (проект № 0706-2020-0019).

Литература

1. Perevoshchikova KA et al. Synthesis of novel lipophilic tetraamines with cytotoxic activity // *Mendeleev Commun.* — 2019. — № 29. — P. 616-618.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-165-167

CYTOTOXICITY AND MICELLAR PROPERTIES OF SYMMETRIC LIPOPHILIC POLYAMINES

Perevoshchikova K.A., Shcheglova E.A., Makarova D.M., Puchkov P.A., Shmendel E.V., Maslov M.A.

Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA - Russian Technological University, Moscow, Russia
 119571, Vernadsky Ave, 86
 e-mail: perevocshikova@mirea.ru

Micelle-forming symmetric lipophilic polyamines were obtained. Minimal CMC values were defined for norspermine-based derivatives. Cytotoxicity test of symmetric lipophilic polyamines showed a increase of IC_{50} in comparison of unsymmetrical analogs.

Key words: polyamines, glycerolipids, micelles, cytotoxicity

Natural polyamine spermine and its precursors are essential for cell growth in eukaryotes. Intracellular polyamine (PA) concentrations are highly regulated at the levels of biosynthesis, uptake, and catabolism. Elevated intracellular levels of PAs are known to be associated with cancer and other diseases related to altered proliferation.

Symmetric or non-symmetric terminally substituted natural and synthetic polyamines exhibited significant antitumor effects. In our early studies non-symmetric lipophilic polyamines with high cytotoxic activity against various cancer cells were developed [1].

In this work symmetric lipophilic polyamines based on norspermine and triethylenetetramine (TETA) were elaborated. Diglycerides with various hydrocarbon chain lengths were used as lipophilic domains. Although the compounds synthesized appear to be poorly soluble in water, they formed micelles in a mM range. We found out that the augmentation of the hydrocarbon chain length (C_{10} - C_{18}) in the diglyceride residue led to the decrease of critical micelle concentration (CMC). Minimal CMC values were found for the norspermine-based polyamines.

For a micellar aqueous solution of a triethylenetetramine derivative with octadecyl substituent, cytotoxicity was evaluated against colon adenocarcinoma cells (HCT116). The results showed that the IC_{50} values were of a symmetric TETA derivative was four folds higher than the activity of its monosubstituted asymmetric analogue.

This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project no. 0706-2020-0019).

References

1. Perevoshchikova KA et al. Synthesis of novel lipophilic tetraamines with cytotoxic activity // *Mendeleev Commun.* – 2019. – № 29. – P. 616-618.

УДК: 618.19-006.04-078.33, ББК: 28.707.4 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-167-169

РЕПЕРТУАР ЦИРКУЛИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПОДТИПОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

С.В.Подлесных¹, К.Е.Абрамова¹, Е.А.Колосова¹, В.С.Дрозд¹, А.А.Гордеева¹, Я.Н.Шойхет², А.Ф.Лазарев²,
С.А.Джонстон³, А.И.Шаповал^{1,3}

¹ ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Россия, 656049, Барнаул, пр. Ленина, 61
e-mail: step-uch@mail.ru, 89236474107

² ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Россия, 656038, Барнаул,
пр. Ленина, 40

³ Центр инноваций в медицине, Институт Биодизайна, Университет штата Аризона, Аризона, США, США,
85287, Темпи, McAllister Ave, 1001 S

Представлены результаты работы, по оценке репертуара циркулирующих антител, с использованием технологической платформы – пептидные микрочипы. В ходе работы, выявлены пептиды, взаимодействующие с циркулирующими антителами плазмы крови пациентов с разными молекулярными подтипами рака молочной железы.

Ключевые слова: иммунный ответ; пептидные микрочипы; циркулирующие антитела; диагностика рака.

Раннее обнаружение и понимание молекулярных особенностей рака молочной железы является важнейшим фактором для успешной терапии пациентов. По данным современных исследований, особое значение в противоопухолевой защите имеет иммунный ответ [1-3]. Антитела, которые производит иммунная система человека, против опухолевых антигенов, могут служить индикатором онкологических заболеваний [4]. Изменения в репертуаре циркулирующих антител являются перспективным биомаркером онкологических заболеваний. Пептидные микрочипы, содержащие несколько тысяч пептидов со случайными аминокислотными последовательностями, могут быть использованы для анализа репертуара циркулирующих антител при диагностике онкологических заболеваний.

Цель данного исследования – оценить возможность применения репертуара антител в качестве оптимального и информативного метода диагностики и определения подтипа рака молочной железы.

Исследование репертуара антител проводилось на микрочипах, содержащих 330 тысяч пептидов со случайными аминокислотными последовательностями. Исследован 81 образец плазмы крови пациентов женского пола, возраст которых составлял от 39 лет до 68. Из них 40 образцов плазмы больных раком молочной железы (РМЖ), и 41 образец здоровых доноров (контроль).

Используя пептидные микрочипы, мы показали, что в плазме крови пациентов с диагнозом рак молочной железы (РМЖ) обнаруживаются антитела, взаимодействующие с определенными пептидами [5]. Кроме того, циркулирующие антитела пациентов с различными молекулярными подтипами ВС (люминальный А, люминальный В и базальноподобный («тройной негативный»)) взаимодействуют с разными, но перекрывающимися панелями пептидов. Были выявлены 634 пептида из 330 тыс. пептидов, представленных на микрочипах, которые специфически взаимодействуют с циркулирующими антителами плазмы крови пациентов при различных биологических подтипах РМЖ. Мы определили аминокислотные последовательности этих пептидов и общие мотивы между ними. Были выявлены гомологии этих пептидов с природными белками, связанные с онкогенезом рака молочной железы и различных опухолей.

Данная панель пептидов, которые специфически взаимодействуют с иммуноглобулинами плазмы крови пациентов с различными молекулярными подтипами РМЖ, может быть использована для разработки не инвазивных диагностических тест-систем.

Микрочипы, содержащие пептиды со случайными аминокислотными последовательностями, могут быть использованы для создания инструментов изучения репертуара циркулирующих антител при

диагностики онкологических заболеваний и молекулярного скрининга популяций, подверженных риску онкологических заболеваний.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (№ FZMW-2020-0007) и Российского фонда фундаментальных исследований (№ 17-54-33003).

Литература

1. Шаповал А.И. [и др.] Иммуносигнатура (immunosignature) - пептидные микроэrray для диагностики рака и других заболеваний // Российский онкологический журнал. – 2014. – Т. 19. – № 4. – С. 6-11.
2. Chen L. [et al.] Immunosignature screening for multiple cancer subtypes based on expression rule // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2019. – Vol. 7. – P. 370.
3. Kobayashi M. [et al.] Development of autoantibody signatures for common cancers // *Seminars in Immunology*. – 2020. – P. 101388.
4. Legutki J.B. [et al.] Scalable high-density peptide arrays for comprehensive health monitoring // *Nature communications*. – 2014. – Vol. 5. – № 1. – P. 1-7. 5. Подлесных С.В. [и др.] Высокоспецифичный и чувствительный анализ репертуара сывороточных антител с помощью пептидных микрочипов у пациентов с диагнозом рак молочной железы // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2017. – Т. 62. – №. 9. – С. 557-563.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-167-169

REPertoire OF CIRCULATING ANTIBODIES FOR DIAGNOSING MOLECULAR SUBTYPES OF BREAST CANCER

S.Podlesnykh¹, K.Abramova¹, E.Kolosova¹, V.Droz¹, A.Gordeeva¹, J.Shoikhet², A.Lazarev², S.Johnston³, A.Chapoval^{1,3}

¹ Altai State University, Russia, 656049, Barnaul, Lenin Ave., 61

² Altai State Medical University, Russia, 656038, Barnaul, Lenin Ave., 40

³ Center for Innovations in Medicine, The Biodesign Institute, Arizona State University, USA, 85287, Tempe, McAllister Ave., 1001 S

In this work, the results of work on the assessment of the repertoire of circulating antibodies using a technological platform - peptide microarray. In the course of the work, peptides were identified that interact with circulating antibodies in blood plasma of patients with different molecular subtypes of breast cancer.

Key words: immune response; peptide microarray; circulating antibodies; diagnosis of cancer.

Early detection and understanding of the molecular characteristics of breast cancer is critical to successful therapy. According to the data of modern studies, the immune response is of particular importance in antitumor protection [1-3]. Antibodies produced by the human immune system against tumor antigens may serve as an indicator of cancer [4]. Changes in the repertoire of circulating antibodies are promising biomarkers of cancer. Peptide microarrays containing several thousands of random amino acid sequences peptides can be used to analyze the repertoire of circulating antibodies for the diagnostics of oncological diseases.

The purpose of this study is to investigate the possibility of using the antibody repertoire as an optimal and informative method for diagnostic and determining various molecular subtypes of breast cancer. The analysis of antibodies repertoire was carried out using microchips containing 330 thousand peptides with random amino acid sequences. 81 samples of blood plasma of female patients age ranging from 39 to 68 years, were examined. Of these, 40 plasma samples of patients with breast cancer (BC), and 41 samples of healthy donors (control).

Using these peptide microarrays, we have shown that in the blood of patients diagnosed with breast cancer (BC) antibodies interacting with certain peptides can be determined [5]. Moreover, circulating antibodies of patients with different molecular subtypes of BC (Luminal A, Luminal B and Basal-like ("triple negative")) interact with different, but overlapping, panels of peptides.

We have selected 634 peptides from 330000 peptides presented on microarrays that specifically interact with circulating antibodies of blood plasma from patients with various molecular subtypes of BC. We have determined the amino acid sequences of these peptides and the common motifs between the peptides. We have identified the homology of these peptides with natural proteins associated with the oncogenesis of breast cancer and various tumors.

This panel of peptides that specifically interact with the blood plasma immunoglobulins of patients with various molecular BC subtypes can be utilized for the development of non-invasive diagnostic test systems.

Microarrays containing peptides with random amino acid sequences can be used to develop tools for the analysis of circulating antibodies repertoire in cancer diagnostics and molecular screening of populations at risk of malignancies.

Grant: This work was supported by the state task of the Ministry of Science and Higher Education of Russia (№ FZMW-2020-0007) and Russian Foundation for Basic Research (No. 17-54-33003).

References

1. Chapoval A.I. [et al.] *Immunosignature-peptide microarray for diagnostic of cancer and other diseases // Russ. Oncol. J.* – 2014. – Vol. 19. – № 4. – P. 6-11. (In Russ).
2. Chen L. [et al.] *Immunosignature screening for multiple cancer subtypes based on expression rule // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* – 2019. – Vol. 7. – P. 370.
3. *Development of autoantibody signatures for common cancers / M. Kobayashi [et al.] // Seminars in Immunology.* – Academic Press, 2020. – P. 101388.
4. Legutki J.B. [et al.] *Scalable high-density peptide arrays for comprehensive health monitoring // Nature communications.* – 2014. – Vol. 5. – № 1. – P. 1-7. 5. Podlesnykh S.V. [et al.] *The highly specific and sensitive analysis of repertoire of serum antibodies using peptide microchips in patients with diagnosis of breast cancer // Klinicheskaja laboratornaia diagnostika.* – 2017. – Vol. 62. – №. 9. – P. 557-563. (In Russ).

УДК 547.415.5:547.922 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-169-171

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ СВЯЗУЮЩЕГО КОМПОНЕНТА КАТИОННЫХ ЛИПОСОМ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Пучков П.А., Егоров Д.Д., Маслов М.А.

Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия
119571, г. Москва, пр. Вернадского, 86
e-mail: puchkov_pa@mail.ru

Для доставки нуклеиновых кислот получены катионные липосомы на основе димерного поликатионного амфифила, для которого разработан новый подход к синтезу. Проведено сравнение нового подхода на основе реакции Мицунобу с используемым ранее.

Ключевые слова: катионные липосомы; катионные амфифилы; генная терапия.

Генная терапия представляет собой перспективную стратегию лечения тяжелых, в том числе онкологических, заболеваний за счет введения терапевтических нуклеиновых кислот. Для введения требуются специальные системы доставки, защищающие нуклеиновые кислоты от воздействия биологических факторов. Одной из таких систем доставки являются катионные липосомы, формируемые на основе катионных амфифилов. Для повышения эффективности в состав катионных липосом могут добавляться и дополнительные компоненты, однако именно катионные амфифилы отвечают за связывание и защиту нуклеиновых кислот на пути к месту действия. Ранее нами были получены и успешно использованы для доставки генетического материала катионные липосомы на основе димерного поликатионного амфифила 2X3 [1]. Увеличение степени использования данной системы в различных проектах требует повышения эффективности технологии на всех стадиях. Одной из таких стадий является получение поликатионного амфифила 2X3 как основного компонента катионных липосом. Структура соединения представляет собой поликатионную матрицу на основе спермина, связанную гексаметиленовыми спейсерами с двумя гидрофобными доменами на основе холестерина.

В данной работе нами использован новый подход к синтезу амфифила на основе реакции Мицунобу [2]. В реакцию вводили сульфонамид на основе региоселективно защищенного производного спермина и гидроксипроизводное холестерина. Последнее получали взаимодействием б-аминогексанола с активированными производными холестерина, такими как хлорформиат. Для успешного протекания реакции Мицунобу потребовалось использовать динитробензолсульфамиды, обладающие большей реакционной способностью. Динитробензолсульфанильные группы удалялись в присутствии избытка пропиламина, трет-бутоксикарбонильные защитные группы – стандартным кислым гидролизом. Структуру всех соединений подтверждали с помощью ЯМР-спектроскопии.

Сравнение нового подхода на основе реакции Мицунобу с предыдущим на основе реакции Фукуямы [3] показало преимущество первого в плане трудовых и временных затрат, а также небольшого повышения

общего выхода конечного соединения. Таким образом, была проведена оптимизация технологии получения связующего компонента – димерного поликатионного амфифила. На его основе, а также использовании липида-помощника DOPE (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин) были сформированы катионные липосомы, которые будут использованы для доставки различных типов нуклеиновых кислот *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (гос. задание № 0706-2020-0019).

Литература

1. Maslov M.A., Kabilova T.O., Petukhov I.A., Morozova N.G., Serebrennikova G.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Novel cholesterol spermine conjugates provide efficient cellular delivery of plasmid DNA and small interfering RNA // *J. Control. Release*. 2012. V. 160. P. 182-193.
2. Camp D., Jenkins I.D. The mechanism of the Mitsunobu esterification reaction. Part I. The involvement of phosphoranes and oxyphosphonium salts // *The Journal of Organic Chemistry*. 1989. V. 54. P. 3045–3049.
3. Fukuyama T., Jow C.-K., Cheung M. 2- and 4-Nitrobenzenesulfonamides: Exceptionally Versatile Means for Preparation of Secondary Amines and Protection of Amines // *Tetrahedron Letters*. 1995. V. 36. №. 36. P. 6373–6374.

UDC 547.415.5:547.922 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-169-171

OPTIMIZATION OF THE TECHNOLOGY OF BINDING COMPONENT PREPARATION FOR CATIONIC LIPOSOMES IN GENE THERAPY

Puchkov P.A., Egorov D.D., Maslov M.A.

Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University, Moscow, Russia
 119571, Moscow, Vernadsky ave. 86
 e-mail: puchkov_pa@mail.ru

Cationic liposomes for nucleic acid delivery were prepared from dimeric polycationic amphiphile. Novel synthetic approach was developed for that. Comparison of both novel approach based on Mitsunobu reaction and previous one is provided.

Key words: cationic liposomes, cationic amphiphiles, gene therapy.

Gene therapy is a perspective strategy for the treatment of severe diseases including oncologic ones by introduction of therapeutic nucleic acids. For that, a special system is needed for nucleic acid protection against biological factors. One of such delivery system are cationic liposomes based on cationic amphiphiles. Unfortunately, they do not possess a high enough efficiency for clinical applications. To improve delivery efficiency additional components may be introduced into formulations of cationic liposomes, however cationic amphiphiles are the only components responsible for binding and protection of nucleic acids on their way to the site of action. Recently, we obtained cationic liposomes based on the dimeric polycationic amphiphile 2X3 [1] and used them successfully for the delivery of genetic material. Expanding use of our system in different projects require improving in technology efficiency in all stages. One of such stages is the preparation of polycationic amphiphile 2X3 as the main component of cationic liposomes. Compound structure represents a polycationic matrix based on spermine connected via hexamethylene spacers with two hydrophobic domains based on cholesterol.

In this work, we used a novel approach to the synthesis of the amphiphile based on Mitsunobu reaction [2]. Sulfonamide based on regioselectively protected derivative of spermine and hydroxyl derivative of cholesterol were used in this reaction. The latter was obtained by the interaction between 6-aminohexanol and activated derivatives of cholesterol like chloroformate. For Mitsunobu reaction was successful dinitrobenzenesulfonamides with greater reactivity were needed. Dinitrobenzenesulfonic groups were removed in the presence of excess of propylamine. *Tert*-butoxycarbonyl protection groups were removed using standard protocol of acidic hydrolysis. Structures of all compounds were confirmed by NMR-spectroscopy.

Comparison of the novel approach based on Mitsunobu reaction and the previous one based on Fukuyama reaction [3] showed superiority of the novel approach in labor and time costs as well as some improving of the overall yield. Thereby, the optimization of the technology of binding component (dimeric polycationic amphiphile) preparation was provided. Based on it as well as helper lipid DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl ethanolamine) cationic liposomes were formed, which will be used for the delivery of different types of nucleic acids *in vitro*.

This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project no. 0706-2020-0019)

References

1. Maslov M.A., Kabilova T.O., Petukhov I.A., Morozova N.G., Serebrennikova G.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Novel cholesterol spermine conjugates provide efficient cellular delivery of plasmid DNA and small interfering RNA // *J. Control. Release*. 2012. V. 160. P. 182-193.
2. Camp D., Jenkins I.D. The mechanism of the Mitsunobu esterification reaction. Part I. The involvement of phosphoranes and oxyphosphonium salts // *The Journal of Organic Chemistry*. 1989. V. 54. P. 3045–3049.
3. Fukuyama T., Jow C.-K., Cheung M. 2- and 4-Nitrobenzenesulfonamides: Exceptionally Versatile Means for Preparation of Secondary Amines and Protection of Amines // *Tetrahedron Letters*. 1995. V. 36. №. 36. P. 6373–6374.

УДК 544.77 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-171-173

МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ С ОБОЛОЧКОЙ ИЗ АЛЬБУМИНА КАК УНИВЕРСАЛЬНАЯ НАНОПЛАТФОРМА ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ К ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМ НОВООБРАЗОВАНИЯМ

Семкина А.С.^{1,2}, Скорикив А.С.³, Иванова А.В.⁴, Абакумов М.А.^{1,4}, Чехонин В.П.^{1,2}

¹ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия
117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

² ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России, Москва, Россия
119034, Москва, Кропоткинский пер., д. 23

³ EMAT - Антверпенский университет, Антверпен, Бельгия
В-2020, Антверпен, Груненборгерлан 171

⁴ ФГАОУ НИТУ «МИСиС», Москва, Россия
119991, Москва, Ленинский пр-т, 4
e-mail: alevtina.semkina@gmail.com

Разработаны и получены магнитные наночастицы оксида железа, покрытые оболочкой из сывороточного альбумина, способные выступать в качестве контрастных агентов для МРТ-диагностики различных опухолей, а также в качестве наноконтейнера для доставки химио- и иммунопрепаратов.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, МРТ, онкология, контрастные агенты, альбумин, химиотерапия, иммунотерапия

Адресная доставка диагностических и терапевтических агентов с помощью различных наночастиц (НЧ) в настоящее время является крайне актуальной темой биомедицинских исследований. Неспецифическое распределение лекарственных средств в организме зачастую вызывает нежелательные побочные эффекты, а чувствительности даже самых современных методов диагностики порой недостаточно для выявления патологий на ранних стадиях. Особое значение направленная доставка препаратов имеет в рамках борьбы с онкологическими заболеваниями, раннее диагностирование которых зачастую является одним из важнейших факторов успешного лечения, а снижение дозы химио- и иммунопрепаратов за счет их специфического транспорта в опухолевую ткань позволяет значительно облегчить состояние пациентов в ходе терапии.

Были получены НЧ маггемита, стабилизированные покрытием из сывороточного альбумина, имеющие гидродинамический диаметр 36 ± 7 нм и дзета-потенциал -30 ± 5 мВ и позволяющие визуализировать целый ряд экспериментальных опухолей у животных (аденокарцинома молочной железы 4Т1, глиобластома С6, гепатокарцинома RS-1, карцинома толстой кишки СТ26) методом МРТ. Загрузка доксорубицина (8 масс.%) или цисплатина (20 масс.%) на поверхность НЧ привела к созданию стимул-чувствительных систем доставки химиопрепаратов, обеспечивающих интенсивное высвобождение терапевтических молекул в опухолевой ткани. Внутривенное введение НЧ с цисплатином приводило к уменьшению объема глиомы С6 у крыс, в то время как терапия с помощью конъюгированных с моноклональными антителами к VEGF НЧ с доксорубицином увеличила медиану выживаемости мышей с аденокарциномой молочной железы 4Т1 на 50% по сравнению со свободным химиопрепаратом. Модификация поверхности НЧ гуанидином привела к изменению дзета-потенциала (до -13 ± 2 мВ), что позволило электростатически связать с НЧ CrG-олигонуклеотид

(10 масс.%), способный активировать противоопухолевую активность макрофагов в ходе иммунотерапии. В результате экспериментов *in vitro* установлено, что покрытые сывороточным альбумином НЧ маггемита активно поглощаются макрофагами, а значит, смогут обеспечить направленный транспорт иммунопрепарата к патологическому очагу, увеличивая эффективность терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №18-29-09061.

Литература

1. Semkina, A.S., Abakumov, M.A., Grinenko, N.F., Lipengolts, A.A., Nukolova, N.V., Chekhonin, V.P. (2017) *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 162 (6), pp. 808-811.
2. Semkina, A.S., Abakumov, M.A., Skorikov, A.S., Abakumova, T.O., Melnikov, P.A., Grinenko, N.F., Cherepanov, S.A., Vishnevskiy, D.A., Naumenko, V.A., Ionova, K.P., Majouga, A.G., Chekhonin, V.P. (2018) *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 14 (5), pp. 1733-1742.

UDC 544.77 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-171-173

ALBUMIN-COATED MAGNETIC NANOPARTICLES AS A UNIVERSAL NANOVEHICLE FOR TARGETED DELIVERY OF DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC AGENTS TO MALIGNANT TISSUES

Semkina A.S.^{1,2}, Skorikov A.S.³, Ivanova A.V.⁴, Abakumov M.A.^{1,4}, Chekhonin V.P.^{1,2}

¹ Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Moscow, Russia
117997, Moscow, Ostrovitianov str. 1

² NIITSPN V.P. Serbsky of the Ministry of Health of the Russian, Moscow, Russia
119034, Moscow, Kropotkinsky lane 23

³ EMAT – University of Antwerp, Antwerp, Belgium
B-2020, Antwerp, Groenenborgerlaan 171

⁴ National Research Technological University "MISiS", Moscow, Russia
119049, Moscow, Leninskiy prospekt 4
e-mail: alevtina.semkina@gmail.com

Albumin-coated iron oxide magnetic nanoparticles were designed and synthesized. It can act as contrast agents for MRI diagnostics of various tumors, as well as a nanovehicle for targeted delivery of chemotherapy and immunotherapy drugs.

Key words: magnetic nanoparticles, MRI, oncology, contrast agents, albumin, chemotherapy, immunotherapy.

Targeted delivery of diagnostic and therapeutic agents using various nanoparticles (NPs) is currently an extremely valuable topic in biomedical research. The non-specific distribution of drugs within the body often causes undesirable side effects. On the other hand, the sensitivity of even the most modern diagnostic methods is sometimes not enough to detect pathologies in the early stages. The targeted delivery of drugs is of particular importance in the field of cancer because its early diagnosis is often one of the most important factors of successful treatment. Additionally, the decrease of chemotherapy and immunotherapy drugs doses due to their targeted delivery into tumor tissues can significantly relieve the condition of patients during the therapy.

We obtained maghemite NPs stabilized by a serum albumin coating with a hydrodynamic diameter of 36 ± 7 nm and zeta potential of -30 ± 5 mV. Due to the contrast properties of these NPs, it is possible to effectively detect a number of experimental tumors in animals (4T1 mammary adenocarcinoma, C6 glioblastoma, RS-1 hepatocarcinoma, colon carcinoma CT26) by MRI. Loading of doxorubicin (8 wt.%) or cisplatin (20 wt.%) onto the surface of NPs led to the obtaining of stimulus-responsive systems for the chemotherapy drugs delivery, which can provide an intensive release of therapeutic molecules in the tumor tissue. Intravenous administration of NPs with cisplatin resulted in the decrease of C6 glioma volume in rats, while therapy with NPs with doxorubicin and monoclonal antibodies against VEGF increased the median survival of mice with 4T1 mammary adenocarcinoma by 50% compared with free doxorubicin. Chemical modification of the NPs surface with guanidine changed zeta potential value (up to -13 ± 2 mV). Thus it became possible to bind CpG oligonucleotide with NPs surface due to electrostatic interactions formation (10 wt%). CpG oligonucleotide is capable of activating the antitumor activity of macrophages during immunotherapy. As a result of *in vitro* experiments, it was found that coated with serum albumin maghemite NPs are actively absorbed by macrophages, which means they can provide targeted delivery of the immunotherapy drugs to the malignant tissues with the increase of therapy effectiveness.

This study was supported by the RFBR grant №18-29-09061.

References

1. Semkina, A.S., Abakumov, M.A., Grinenko, N.F., Lipengolts, A.A., Nukolova, N.V., Chekhonin, V.P. (2017) *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 162 (6), pp. 808-811.
2. Semkina, A.S., Abakumov, M.A., Skorikov, A.S., Abakumova, T.O., Melnikov, P.A., Grinenko, N.F., Cherepanov, S.A., Vishnevskiy, D.A., Naumenko, V.A., Ionova, K.P., Majouga, A.G., Chekhonin, V.P. (2018) *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 14 (5), pp. 1733-1742.

УДК 544.77.03 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-173-174

ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ В ИММУНОАНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА РАЗВЕТВЛЕННОЙ МОРФОЛОГИИ – «НАНОЦВЕТОВ»

Серебrenникова К.В., Петракова А.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33
e-mail: ksenijasereb@mail.ru*

Методами двухстадийного синтеза получены препараты наночастиц золота разветвленной морфологии – «наноцветов» – и их конъюгаты с антителами. Рассмотрено применение «наноцветов» в иммунохроматографическом анализе, проведено их сопоставление с традиционно используемыми сферическими наночастицами, охарактеризованы преимущества «наноцветов».

Ключевые слова: коллоидное золото, нанодисперсные маркеры, наночастицы с разветвленной поверхностью, иммуноанализ, тест-системы

В различных аналитических системах активно используется мечение антител наночастицами золота. Традиционно для этой цели используются наночастицы близкой к сферической формы, получаемые одностадийной восстановительной реакцией. Однако развитие методов коллоидной химии позволяет существенно расширить ряд кандидатных наночастиц-маркеров, применение которых в иммуноанализе на сегодняшний день ограничивается единичными разработками.

В проведенном исследовании рассмотрено применение в иммунохроматографических тест-системах наночастиц с разветвленной поверхностью, так называемых «наноцветов». «Наноцветы» получали методом двухступенчатого синтеза с промежуточной стадией образования зародышей и дальнейшим объединением ростового раствора с суспензией зародышей. Получены серии препаратов, отличающихся по размерам зародышевых наночастиц и концентрациям золота в ростовом растворе. Морфология «наноцветов» подтверждена методом просвечивающей электронной микроскопии.

Наночастицы золота в форме цветов обладают большой площадью поверхности, что позволяет увеличить число иммобилизуемых на их поверхности антител и потенциально повысить реакционную способность конъюгатов. При этом для синтеза стабильных иммуноконъюгатов с «наноцветами» требуется примерно в два раза меньше антител по сравнению со сферическими наночастицами того же размера. Сдвиг пика плазмонного резонанса несферических частиц в длинноволновую область обеспечивает более интенсивную контрастную окраску, снижающую предел обнаружения как для визуальной, так и для приборной регистрации результатов иммунохроматографии.

Показано эффективное применение «наноцветов» в различных форматах иммунохроматографического анализа – конкурентном на примере микотоксина Т2-токсина и сэндвич-анализе на примере белка, связывающего жирные кислоты.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-08-01397).

UDC 544.77.03 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-173-174

OBTAINING AND APPLICATION IN IMMUNOANALYTIC SYSTEMS OF GOLD NANOPARTICLES WITH BRANCHED MORPHOLOGY ("NANOFLOWERS")

Serebrennikova K.V., Petrakova A.V., Byzova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.

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

Preparations of gold nanoparticles of branched morphology, "nanoflowers", and their conjugates with antibodies were obtained by two-stage synthesis methods. The application of "nanoflowers" in immunochromatographic analysis is considered, their comparison with the traditionally used spherical nanoparticles is carried out; the advantages of "nanoflowers" are characterized.

Key words: colloidal gold, nanodispersed markers, nanoparticles with a branched surface, immunoassay, test systems

Labeling of antibodies with gold nanoparticles is actively used in various analytical systems. Traditionally, for this purpose, nanoparticles of close to spherical shape are applied, which are obtained by a one-stage reduction reaction. However, the development of colloidal chemistry methods makes it possible to significantly expand the range of candidate nanoparticle markers, the use of which in immunoassay is currently limited to few developments.

The study considered the use of nanoparticles with a branched surface, so-called "nanoflowers", in immunochromatographic test systems. "Nanoflowers" were obtained by the method of two-stage synthesis with an intermediate stage of nucleation and further combining of the growth solution with a suspension of core nanoparticles. A series of preparations were obtained that differed in the size of the core nanoparticles and the concentration of gold in the growth solution. The morphology of "nanoflowers" was confirmed by the method of transmission electron microscopy.

Gold nanoparticles in the form of flowers have a large surface area, which makes it possible to increase the number of antibodies immobilized on their surface and potentially increase the reactivity of the conjugates. At the same time, for the synthesis of stable immunoconjugates with "nanoflowers", approximately two times less antibodies are required in comparison with spherical nanoparticles of the same size. The shift of the peak of the plasmon resonance of nonspherical particles to the long-wavelength region provides a more intense contrast coloration, which decreases the detection limit for both visual and instrumental recording of the immunochromatographic results.

The effective use of "nanoflowers" in various formats of immunochromatographic analysis has been shown, including the competitive format on the example of mycotoxin T2-toxin as target analyte and sandwich format on the example of fatty acids binding protein.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant No. 18-08-01397).

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-174-176

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ АСТРОЦИТОВ *RATTUS NORVEGICUS* ДО И ПОСЛЕ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С КЛЕТКАМИ ГЛИОМЫ С6

А.С. Силантьев¹, А.А. Чернышева¹, О.В. Побегуц¹, А.Е. Носырев¹, Г.В. Павлова², О.И. Гурина¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 119034, г. Москва, Кропоткинский пер., д. 23
 e-mail: artsilan@gmail.com

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии гена Российской академии наук» 119334, город Москва, улица Вавилова, дом 34/5

Проведён панорамный протеомный анализ клеток глиомы С6, нативных астроцитов крысы и астроцитов крысы, предварительно совместно культивированных с клетками глиомы С6. На основе полученных данных построена предполагаемая модель для диагностической дифференцировки нормальных астроцитов крысы от клеток глиомы С6.

Ключевые слова: астроциты; глиома; масс-спектрометрия; онкология; протеомика.

Глиобластома – самый распространённый и агрессивный вид злокачественной опухоли центральной нервной системы. Она характеризуется неблагоприятным прогнозом, низкой выживаемостью и крайне ограниченными возможностями для терапии. Злокачественные глиомы являются причиной 2,5 % смертей от онкологических заболеваний и являются третьей основной причиной смерти от рака [1-4]. Исследование фундаментальных аспектов биологии развития глиом с использованием биоматериалов пациентов затруднено, поэтому в ходе исследовательской работы необходимо использование экспериментальных моделей.

В нашем исследовании использовалась клеточная линия глиомы C6 *Rattus norvegicus*. Эта одна из клеточных линий, наиболее часто используемых при моделировании глиомы, в частности, из-за того, что её иммунные инфильтраты и механизмы ухода от иммунного ответа обладают подобием к таковым у мультиформной глиобластомы человека.

Цель данной работы заключалась в поиске и анализе различий в протеомном составе между клетками глиомы C6 и астроцитами до и после их ко-культивирования. Для количественной оценки вариативности протеома до и после совместного культивирования двух клеточных линий мы использовали ВЭЖХ-МС в дополнении с безметковой количественной оценкой.

На основании проведённого анализа выявлены белки, уровни представленности которых достоверно изменяются между экспериментальными группами. Проведена оценка роли данных белков в развитии онкологического процесса в центральной нервной системе. Выдвинуты гипотезы о роли ряда белков в онкологических процессах в центральной нервной системе и о их роли в качестве прогностических и диагностических маркеров.

Финансирование: работа выполнена в рамках темы государственного задания АААА-А19-119031390112-1 и при поддержке грантов РФФИ 17-00-00161 КОМФИ, 17-00-00157 КОМФИ и 17-00-00162 КОМФИ.

Литература

1. Westermarck, Bengt. "Glioblastoma—a moving target". *Uppsala journal of medical Sciences*. 117.2 (2012): 251–256.
2. Salzman, Michael. "Malignant glioma management". *Neurosurgery Clinics of North America*. 1.1 (1990): 49–63.
3. Lombardi, Giuseppe, et al. "Diagnostic value of plasma and urinary 2-hydroxyglutarate to identify patients with isocitrate dehydrogenase-mutated glioma". *The oncologist*. 20.5 (2015): 562–567
4. Mallick, Supriya, et al. "Management of glioblastoma after recurrence: A changing paradigm". *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. 28.4 (2016): 199–210.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-174-176

PROTEOMIC ANALYSIS OF ASTROCYTE CELL LINE BEFORE AND AFTER CO-COCULTIVATION WITH *RATTUS NORVEGICUS* GLIOMA C6 CELLS

Silant'ev A.S., Chernysheva A.A., Pobeguts O.V.

V.P. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Ministry of Health of the Russian Federation
Russian Federation, 119034, Moscow, Kropotkinskiy pereulok, 23
IGB RAS, 119334, Moscow, Vavilova street, 34/5
e-mail: artsilan@gmail.com

We performed panoramic proteomic analysis of rat C6 glioma cells, native rat astrocytes and rat astrocytes co-cultivated with C6 glioma cell line. Based on the data, a putative model was present for the diagnostic differentiation of normal rat astrocytes from C6 glioma cells.

Key words: astrocytes; glioma; mass spectrometry; oncology, proteomics.

Glioblastoma is the most common and aggressive type of the central nervous system tumor. It is characterized by a poor prognosis, low survival rate, and limited therapy options. Gliomas are responsible for 2.5 % of deaths from cancer and are the third leading cause of cancer deaths [1-4]. The research of the fundamental biology aspects of gliomas by using patient biomaterials is difficult. That is why it is necessary to use experimental models in the research work.

In our study, we used a C6 *Rattus norvegicus* glioma cell line. It is one of cell lines that is often utilized to model

of glioma, in particular because its immune infiltrates and mechanisms of immune response avoiding are like human glioblastoma.

The aim of this study is research and analysis in differences between C6 glioma cells and astrocytes before and after co-cultivation in proteomic level. To quantify the proteome variability before and after co-cultivation of two cell lines, we used the LC-MS couples with Label Free Quantification (LFQ) approach.

As a result, we identified proteins with abundance changed between the experimental groups. The role of those proteins in the development of the oncological process in the central nervous system was evaluated. We present hypotheses about the role of proteins in oncological processes in the central nervous system and their role as prognostic and diagnostic markers.

The research was carried out within the state assignment AAAA-A19-119031390112-1 and was supported by RFBR grant 17-00-00161, 17-00-00157 и 17-00-00162.

References

1. Westermarck, Bengt. "Glioblastoma—a moving target". *Upsala journal of medical Sciences*. 117.2 (2012): 251–256.
2. Salzman, Michael. "Malignant glioma management". *Neurosurgery Clinics of North America*. 1.1 (1990): 49–63.
3. Lombardi, Giuseppe, et al. "Diagnostic value of plasma and urinary 2-hydroxyglutarate to identify patients with isocitrate dehydrogenase-mutated glioma". *The oncologist*. 20.5 (2015): 562–567.
4. Mallick, Supriya, et al. "Management of glioblastoma after recurrence: A changing paradigm." *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. 28.4 (2016): 199–210.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-176-179

МУЛЬТИСЕНСОРНАЯ ОБУЧАЕМАЯ СИСТЕМА ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЧЕЛОВЕКА В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

О.Ю.Созинова¹, А.Ю.Зайцева¹, Ю.Я.Кисляков¹, М.С.Мазинг¹, С.А.Авдюшенко²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Россия, 198095, Санкт-Петербург, Ивана Черных, 31-33, e-mail: anna@da-24.ru, 89219664601

² ФГБВОУ ВО Военно-медицинская Академия имени С.М. Кирова МО РФ, Россия, 194044, Санкт-Петербург, Академика Лебедева, 6, e-mail: anna@da-24.ru, 89219664601

Выполнение проекта реализует новый принцип неинвазивной диагностики и медико-биологических исследований с применением искусственной мультисенсорной обучаемой аналитической системы для контроля профессиональной пригодности военнослужащих по показателям конденсата выдыхаемого воздуха, в котором в значительном количестве присутствуют продукты обмена веществ. Результаты проведенных исследований показывают, что испытуемые разделяются на группы различной адаптированности и чувствительности к экстремальным условиям. Предложенный метод на основе мультисенсорной обучаемой диагностической системы позволяет осуществлять неинвазивный инструментальный контроль и отбор специалистов для функционирования их в экстремальных условиях высокогорья.

Ключевые слова: мультисенсорная система, электрохимические сенсоры, функциональное состояние человека

Функциональное состояние человека в значительной степени определяется процессами обмена веществ в органах и тканях, продукты которого распределены в биосредах организма и являются надежными индикаторами изменения его функционального состояния. Этот эффект был использован для контроля профессиональной пригодности военнослужащих по показателям конденсата выдыхаемого воздуха, в котором в значительном количестве присутствуют продукты обмена веществ. Для решения данной задачи была разработана обучаемая мультисенсорная диагностическая система, имитирующая организацию и функционирование биологических сенсорных систем. Такой подход в настоящее время начал интенсивно применяться при разработке аналогичных систем при решении различных медико-биологических проблем [1]. Предлагаемый подход отличается от существующих методов тем, что не требует высокоточного определения содержания в биосредах определенных химических компонентов, которое ограничивается уровнем селективности и чувствительности сенсоров к основному измеряемому компоненту и ряду сопутствующих, так называемых, мешающих веществ, а предлагается использовать массив сенсоров с так называемой перекрестной чувствительностью. Каждый сенсор такой системы реагирует на присутствие

сразу нескольких компонентов анализируемой среды. Получаемая совокупность многомерных данных требует современной математической обработки. С этой целью для обработки данных применялся метод главных компонент.

Целью проекта является разработка нового метода оценки функционального состояния военнослужащих по физиологически значимым компонентам конденсата выдыхаемого воздуха. Задачами, решаемыми в результате реализации проекта являются разработка структуры, создание макета обучаемой мультисенсорной диагностической аналитической системы, включающей модуль пробоподготовки и три функциональных модуля: 1) сенсорный, 2) микропроцессорный измерительный и 3) информационный, выполняющий функции формирования образов исследуемого объекта, их запоминание и распознавание. Разработка состава рабочих растворов для калибровки, кондиционирования, хранения сенсоров и оценки их перекрестной чувствительности, методики сбора конденсата, подготовки сенсоров к измерениям, оценки их характеристик в контрольных растворах. Проведение технических и физиологических исследований разработанного макета диагностической системы, экспериментальные исследования влияния экстремальных условий на «образ» испытуемых до и после пребывания в барокамере.

Диагностическая система состоит из 4-х модулей: пробоподготовки, сенсорного, измерительного и информационного анализа. Модуль пробоподготовки обеспечивает отбор пробы конденсата и устройство для установки сенсора в исследуемую среду. Сенсорный модуль состоит из нескольких потенциометрических электродов с основной чувствительностью к ионам Na^+ , K^+ , Cl^- , NO_3^- , Ca^{2+} , F^- и pH и воспроизводимой перекрестной чувствительностью к другим ионам и органическим компонентам конденсата. Он формирует «образ» исследуемой среды в виде композиции электродных потенциалов и pH [2]. Измерительный модуль является высокоточным микропроцессорным измерителем электрических потенциалов сенсоров (предел погрешности измерений ± 0.002 мВ, входное сопротивление 10130 Ом). Информационный модуль содержит комплект методик обработки многомерных данных с помощью метода главных компонент, полученных от измерительного модуля по каналу телеметрической связи. Он реализует функции обучения системы, распознавания многомерных «образов», формируемых сенсорным модулем. Интегральный результат статистически обрабатывается, отображается графически и сохраняется в виде матрицы состояний «образа нормы» [3, 4, 5, 6].

Для отработки методики экспериментального исследования влияния экстремальных условий на «образ» испытуемого были выполнены исследования конденсата выдыхаемого воздуха у 8 испытуемых до и после пребывания в барокамере, которые интерпретировались с помощью проекционного метода анализа коррелированных данных. У группы испытуемых №1-3 наблюдается единообразная форма визуального изменения функционального состояния. Результаты проведенных исследований показывают, что испытуемые разделяются на группы различной адаптированности и чувствительности к экстремальным условиям. Для группы испытуемых с порядковыми номерами №1-3 тип реакции на нахождение в условиях барокамеры единообразен. Направления пар векторов для №№1-3 и №№4-8 почти противоположные относительно оси первой главной компоненты PC1. Какое из двух содержательных изменений более адекватно реальному физическому состоянию испытуемых, можно определить на основе независимого медико-биологического исследования.

Алгоритм проверки подхода в целом может быть следующий: выделение двух групп испытуемых с достоверно прогнозируемой реакцией на нагрузку – группа тренированных спортсменов и группа людей, заведомо чувствительных к нагрузке (людей старшего возраста и малой тренированности). Предпочтительным будет тот способ представления результатов, при котором будет достигаться наилучшая дискриминация исследуемых, относящихся к различным группам [3, 4, 5, 6].

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о работоспособности аналитической системы и перспективе исследований биохимических показателей конденсата выдыхаемого воздуха с применением методов мультисенсорных обучаемых систем с целью оценки адаптированности, функционального состояния и работоспособности специалистов опасных профессий. Таким образом, предложенный метод на основе мультисенсорной обучаемой диагностической системы позволяет осуществлять неинвазивный инструментальный контроль и отбор специалистов для функционирования их в экстремальных условиях высокогорья.

Финансирование: Исследование выполнено в рамках Государственного задания № № 075-01073-20-00 по теме «Микрофлюидные устройства и системы для имитации и исследования процессов в живом организме» СУ НИР 0074-2019-0010.

Литература

1. Власов Ю.Г., Легин А.В., Рудницкая А.М. Мультисенсорные системы типа электронный язык - новые возможности создания и применения химических сенсоров //Успехи химии. 2006. Т. 75. № 2. С. 141-150.

2. Кислякова Л.П., Буляница А.Л., Кисляков Ю.Я., Гуляев В.И. Оценка функционального состояния человека при физических нагрузках по показателям конденсата выдыхаемого воздуха, регистрируемым полиселективными электрохимическими сенсорами с применением проекционных методов многомерного анализа // *Научное приборостроение*. – 2016.–№26 (2). –С.37-47.
3. Kislyakova L.P., Kislyakov Yu.Ya., Zaiceva A.Yu., Gulyaev V.I. Multisensory educational system "Electronic tongue" for the diagnosis of the functional state of the human body on the characteristics of exhaled breath condensate. *Фізіологічний журнал* 2013, т.59, № 4, с. 99-102.
4. Кисляков Ю.Я., Зайцева А.Ю., Кислякова Л.П. Неинвазивный анализ кислородного обеспечения тканей человека при физической нагрузке по показателям полиселективных оптических сенсоров // *Фундаментальные аспекты психического здоровья*. – 2018. – №3. – С. 91-95.
5. Кислякова Л.П., Зайцева А.Ю., Кисляков Ю.Я. Неинвазивный анализ кислородного обеспечения двигательной активности руки по показателям, регистрируемым полиселективной оптической системой // *Естественные и технические науки*. – 2018. – №12. – С. 318-324.
6. Зайцева А.Ю., Кисляков Ю.Я., Кислякова Л.П., Авдюшенко С.А. Искусственная мультисенсорная система контроля функционального состояния специалистов опасных профессий // *Естественные и технические науки*. – 2019. –№ 11. – С. 355-358.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-176-179

MULTISENSORY LEARNING SYSTEM FOR NON-INVASIVE DETERMINATION OF THE FUNCTIONAL STATE OF THE BODY IN EXTREME CONDITIONS

O.Sozinova¹, A.Zaitseva¹, Y.Kislyakov¹, S.Avduschenko²

¹ Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Russia, 198095, Saint Petersburg, Ivana Chernyh, 31-33

² Medical Military Academy, Russia, 1940444, Saint Petersburg, Akademika Lebedeva, 6

The project is implementing a new principle of non-invasive diagnostics and biomedical research using an artificial, multi-sensory, trained analytical system to monitor the professional fitness of military personnel in terms of exhaled air condensate, in which significant metabolic products are present. The results of the studies show that the subjects are divided into groups of different adaptability and sensitivity to extreme conditions. The proposed method based on the multi-sensory trained diagnostic system allows non-invasive instrumental control and selection of specialists for their functioning in extreme conditions of high mountains.

Key words: multisensor system, electrochemical sensors, human functional state

The functional state of a person is largely determined by metabolic processes in organs and tissues, whose products are distributed in the biological environment of the body and are reliable indicators of changes in its functional state. This effect was used to control the professional fitness of military personnel. In terms of expired condensate, in which a significant amount of metabolic products are present. To solve this problem, a trained multisensory diagnostic system was developed that simulates the organization and functioning of biological sensory systems. This approach has now begun to be intensively applied in the development of similar systems in solving various biomedical problems [1]. The proposed approach differs from existing methods in that it does not require high-precision determination of the content in biological media certain chemical components, which is limited by the level of selectivity and sensitivity of the sensors to the main measured component and a number of related, so-called, interfering substances, and it is proposed to use an array of sensors with the so-called cross sensitivity. Each sensor of such a system responds to the presence of several components of the analyzed medium. The resulting set of multidimensional data requires modern mathematical processing. For this purpose, the main component method was used for data processing.

The aim of the project is to develop a new method for assessing the functional state of military personnel by physiologically significant components of the exhaled breath condensate. The tasks to be solved as a result of the project are the development of a structure, the creation of a mock-up of a trained multisensory diagnostic analytical system, including a sample preparation module and three functional modules: 1) sensory, 2) microprocessor-based, and 3) informational, which performs the functions of imaging the studied object, memorizing them, and recognition. Development of the composition of working solutions for calibration, conditioning, storage of sensors and assessment of their cross sensitivity, methods for collecting condensate, preparing sensors for measurements, evaluating their characteristics in control solutions. Carrying out technical and physiological studies of the developed model of the diagnostic system,

experimental studies of the influence of extreme conditions on the "image" of the subjects before and after staying in the pressure chamber.

The diagnostic system shown in Fig. 1 consists of 4 modules: sample preparation, sensory, measuring and information analysis. The sample preparation module provides condensate sampling and a device for installing the sensor in the test medium. The sensor module consists of several potentiometric electrodes with basic sensitivity to Na^+ , K^+ , Cl^- , NO_3^- , Ca^+ , F^- and pH ions and reproducible cross-sensitivity to other ions and organic components of the condensate. It forms an "image" of the studied medium in the form of a composition of electrode potentials and pH [2]. The measuring module is a high-precision microprocessor meter for electric potentials of sensors (limit of measurement error ± 0.002 mV, input resistance 10¹³ Ohms). The information module contains a set of techniques for processing multidimensional data using the principal component method obtained from the measuring module via a telemetric communication channel. It implements the functions of system training, recognition of multidimensional "images" formed by the sensor module. The integral result is statistically processed, displayed graphically and stored as a matrix of states of the "norm image" [3, 4, 5, 6].

To develop a methodology for experimental research of the influence of extreme conditions on the "image" of the subject, studies were conducted of the condensate of exhaled air in 8 subjects before and after being in the pressure chamber, which were interpreted using the projection method for analyzing correlated data. In Fig. 2, in the form of points in two-dimensional space, the images of the state of the subjects are shown during data processing by the principal component method. From the data obtained, it is seen that the group of subjects No. 1-3 exhibits a uniform form of visual change in the functional state.

The results of the studies show that the subjects are divided into groups of different adaptability and sensitivity to extreme conditions. For the group of subjects with serial numbers No. 1-3, the type of reaction to being in a pressure chamber is uniform and is shown in Fig. 2 by arrows. It can be seen that the directions of the pairs of vectors for Nos. 1-3 and Nos. 4-8 are almost opposite relative to the axis of the first main component PC1. Which of two substantial changes is more adequate to the real physical state of the subjects, can be determined on the basis of an independent biomedical study.

The algorithm for testing the approach as a whole can be as follows: the selection of two groups of subjects with a reliably predicted response to the load - a group of trained athletes and a group of people who are obviously sensitive to the load (older people and low fitness). It will be preferable that the way of presenting the results in which the best discrimination of the researchers belonging to different groups will be achieved [3, 4, 5, 6].

The results of the studies indicate the performance of the analytical system and the prospect of studying the biochemical parameters of the exhaled breath condensate using the methods of multisensory training systems in order to assess the adaptability, functional state and performance of specialists in hazardous professions. Thus, the proposed method based on a multisensory trained diagnostic system allows for non-invasive instrumental monitoring and selection of specialists for their functioning in extreme conditions of highlands.

Grant: The study was carried out in the framework of State Assignment No. 075-01073-20-00 on the topic "Microfluidic devices and systems for simulating and studying processes in a living organism" SU NIR 0074-2019-0010.

References

1. Vlasov Yu.G., Legin A.V., Rudnitskaya A.M. Multisensor systems such as electronic language - new possibilities for creating and using chemical sensors // *Uspekhi Khimii*. 2006.V. 75. No. 2. P. 141-150.
2. Kislyakova L.P., Bulyanitsa A.L., Kislyakov Yu.Ya., Gulyaev V.I. Assessment of the functional state of a person during physical exertion according to the expiratory condensate recorded by multiselective electrochemical sensors using projection methods of multivariate analysis // *Scientific Instrument Making*. - 2016. -- No. 26 (2) .- P.37-47.
3. Kislyakova L.P., Kislyakov Yu.Ya., Zaiceva A.Yu., Gulyaev V.I. Multisensory educational system "Electronic tongue" for the diagnosis of the functional state of the human body on the characteristics of exhaled breath condensate. *Physiological Journal* 2013, vol. 59, No. 4, p. 99-102.
4. Kislyakov Yu.Ya., Zaitseva A.Yu., Kislyakova L.P. Non-invasive analysis of the oxygen supply of human tissues during exercise according to the indicators of multiselective optical sensors // *Fundamental aspects of mental health*. - 2018. - No. 3. - S. 91-95.
5. Kislyakova L.P., Zaitseva A.Yu., Kislyakov Yu.Ya. Non-invasive analysis of oxygen supply for motor activity of the hand according to indicators recorded by a poly-selective optical system // *Natural and Technical Sciences*. - 2018. - No. 12. - C. 318-324.
6. Zaitseva A.Yu., Kislyakov Yu.Ya., Kislyakova L.P., Avdyushenko S.A. Artificial multisensory system for monitoring the functional state of specialists in dangerous professions // *Natural and Technical Sciences*. - 2019. —№ 11. - S. 355-358.

УДК 544.77.03 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-180-181

КОНЪЮГАТЫ АНТИТЕЛ С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА КАК КОМПОНЕНТ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ДИАГНОСТИКУМОВ: ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ СИНТЕЗА НА СОСТАВ И РЕАКЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ

Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия
 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33
 e-mail: sotnikov-d-i@mail.ru

Получены серии препаратов наночастиц золота с диаметром от 13 до 60 нм и их конъюгаты с антителами (мышинными иммуноглобулинами класса G) разного состава. Охарактеризован состав конъюгатов и количество антител, сохраняющих реакционную способность в иммобилизованном виде. На примере иммунохроматографических тест-систем для выявления D-димера и C-реактивного белка сопоставлена эффективность конъюгатов как аналитических реагентов.

Ключевые слова: коллоидные частицы, иммуноглобулины, иммобилизация, иммунные комплексы, тест-системы

Конъюгаты наночастиц золота и антител активно используются как компоненты аналитических систем. Взаимодействие с антителами позволяет селективно выявлять различные диагностически значимые соединения, а включение в образующиеся комплексы наночастиц золота обеспечивает возможность простого визуального или приборного выявления аналитов. Однако выбор размеров наночастиц и концентрации используемых при конъюгировании антител основан на эмпирических допущениях и не гарантирует максимальной реакционной способности получаемых препаратов. Сравнительный анализ конъюгатов, получаемых при разных условиях синтеза, позволит обоснованно рекомендовать оптимальные условия, соблюдение которых обеспечит достижение минимальных пределов обнаружения диагностически значимых соединений и высокую воспроизводимость получаемых результатов.

В рамках проведенного исследования охарактеризованы серии препаратов наночастиц золота разного диаметра и их конъюгаты с антителами (мышинными иммуноглобулинами класса G), получаемые при разных соотношениях реагентов. Наночастицы синтезировали восстановлением золотохлористоводородной кислоты различными концентрациями цитрата натрия (метод Френса). Согласно результатам электронно-микроскопических измерений, средний диаметр наночастиц в полученной серии из 6 препаратов варьировал от 13 до 60 нм. Для конъюгирования наночастиц с антителами использовали адсорбционную иммобилизацию. Состав получаемых при этом конъюгатов контролировали ранее разработанным методом, основанным на измерениях флуоресценции триптофановых аминокислотных остатков в исходном препарате антител (в соответствующей среде) и непрореагировавших антител. Для контроля реакционной способности использовали связывание иммобилизованных антител с антигеном, контролируемое по убыли флуоресценции его аминокислотных остатков после отделения коллоидного конъюгата. Для каждой серии препаратов установлены концентрационные зависимости связывания и измерения реакционной способности антител, иммобилизуемых на наночастицах определенного диаметра; определены оптимальные условия синтеза. Полученный массив данных демонстрирует, что в условиях монослойной иммобилизации антител на поверхности наночастиц активность сохраняют от 15 до 28% антиген-связывающих центров иммуноглобулинов G. Показана эффективность выбранных препаратов в системах иммунохроматографической детекции D-димера и C-реактивного белка.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 19-14-00370).

UDC 544.77.03 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-180-181

ANTIBODY CONJUGATES WITH GOLD NANOPARTICLES AS A COMPONENT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC DIAGNOSTICUMS: THE INFLUENCE OF SYNTHESIS CONDITIONS ON THE COMPOSITION AND REACTIVITY

Sotnikov D.V., Byzova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.

*A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
Leninsky prospect 33, 119071 Moscow, Russia
e-mail: zherdev@inbi.ras.ru, sotnikov-d-i@mail.ru*

A series of preparations of gold nanoparticles with diameters from 13 to 60 nm and their conjugates with antibodies (murine immunoglobulins of class G) of different composition were obtained. The composition of the conjugates and the amount of antibodies that retain their reactivity in an immobilized form are characterized. Using the example of immunochromatographic test systems for the detection of D-dimer and C-reactive protein, the effectiveness of conjugates as analytical reagents is compared.

Key words: colloidal particles, immunoglobulins, immobilization, immune complexes, test systems

Conjugates of gold nanoparticles and antibodies are actively used as components of analytical systems. Interaction with antibodies makes it possible to selectively identify various diagnostically significant compounds, and the inclusion of gold nanoparticles in the resulting complexes allows simple visual or instrumental detection of target analytes. However, the choice of the nanoparticles size and the concentration of antibodies used in the conjugation is based on empirical assumptions and does not guarantee the maximum reactivity of the resulting preparations. A comparative analysis of conjugates obtained under different conditions of the synthesis will make it possible to reasonably recommend the optimal conditions, the observance of which will ensure the achievement of the minimum detection limits for diagnostically significant compounds and high reproducibility of the obtained results.

Within the framework of the study, a series of preparations of gold nanoparticles of different diameters and their conjugates with antibodies (murine immunoglobulins of class G) obtained at different ratios of reagents were characterized. The nanoparticles were synthesized by reduction of chloroauric acid by different concentrations of sodium citrate (Frens method). According to the results of electron microscopic measurements, the average diameter of nanoparticles in the obtained series of 6 preparations varied from 13 to 60 nm. Adsorption immobilization was used to conjugate the nanoparticles with the antibodies. The composition of the resulting conjugates was controlled by a previously developed method based on measurements of the fluorescence of tryptophan amino acid residues in the original preparation of antibodies (in an appropriate medium) and in the solution of unreacted antibodies. To control the reactivity, the binding of immobilized antibodies to the antigen was used, which was controlled by the decrease in the fluorescence of the antigen's amino acid residues after the separation from the colloidal conjugate. For each series of preparations, concentration dependences of binding and measuring the reactivity of antibodies immobilized on the nanoparticles of a certain diameter were established; the optimal synthesis conditions were determined. The obtained data demonstrate that under the conditions of monolayer immobilization of antibodies on the surface of the nanoparticles, the activity is retained from 15 to 28% of the antigen-binding sites of immunoglobulins G. The effectiveness of the selected preparations in systems for immunochromatographic detection of D-dimer and C-reactive protein has been shown.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant 19-14-00370).

УДК 544.77.051 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-182-184

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОСИТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АУТОАНТИТЕЛ К ТИРЕОГЛОБУЛИНУ

Стойнова А.М.^{1*}, Зубков А.В.², Станишевский Я.М.¹

¹ Российский университет дружбы народов, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

² Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова Российской академии медицинских наук, 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5а

* e-mail: stoinova17@mail.ru

Изучено модулирующее влияние наночастиц различной природы (золота, серебра, полимерных микросфер) на иммунологические свойства моноклональных аутоантител к основному белку щитовидной железы - тиреоглобулину в сконструированной системе конъюгатов «наночастица-аутоантитело».

Ключевые слова. Наночастицы, тиреоглобулин щитовидной железы человека, наночастицы, серебро, золото, полистирол, иммунодиагностика.

Изучение аутоиммунных заболеваний щитовидной железы являются одной из актуальных задач современной эндокринологии [1].

Методом химического восстановления танином соли серебра (AgNO_3) и золота (HAuCl_4) в присутствии буферного раствора тетрабората натрия с $\text{pH}=9$ были получены наночастицы серебра (Ag) и золота (Au), размером 40 нм. [2].

Методом гетерофазной полимеризации в отсутствие ПАВ были синтезированы полистирольные микросферы с диаметром ~ 700 и 40 нм (St1 и St2). [3].

Иммобилизацию моноклональных аутоантител с наночастицами различной природы проводили методом физической адсорбции смешивая антитела МкАТ 1. и МкАТ 2. в количестве $1,0$ мл с $1,0$ мл раствора наночастиц, с концентрацией 2, 4, 8, 16, 32, 64 мг/мл.

Наличие связывания наночастиц с моноклональными антителами подтверждали электрофорезом белков в геле.

Иммунологические свойства моноклональных аутоантител иммобилизованных с наночастицами серебра (Ag), золота (Au) и полимерных

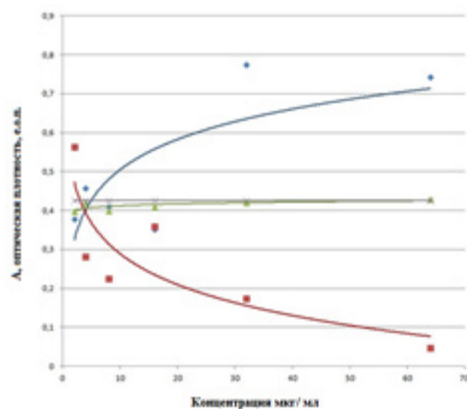


Рис. 1. Зависимость интенсивности ИФА от концентрации наночастиц (аутоантитело МкАТ 2.)

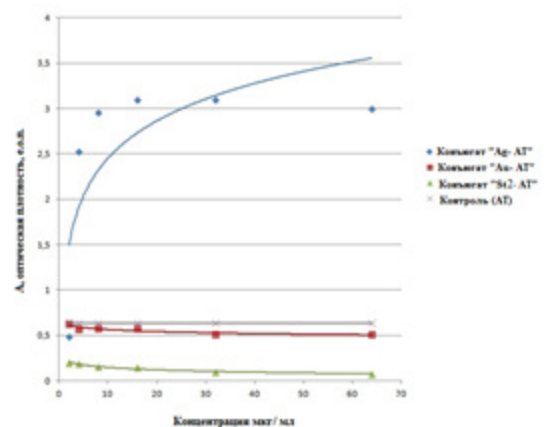


Рис. 2. Зависимость интенсивности результатов ИФА от концентрации наночастиц (аутоантитело МкАТ 1.)

Было выявлено, что использование наночастиц серебра и золота позволяет регулировать чувствительность иммуноферментного анализа с целью повышения или снижения предела обнаружения аутоантител

к тиреоглобулину для раннего выявления заболеваний щитовидной железы в лабораторной диагностике и создания диагностических тест-систем нового поколения. При использовании наночастиц серебра наблюдается дозо-зависимый эффект усиления сигнала ИФА на 100 %, с максимумом при концентрации наночастиц 32 мкг/мл. Для наночастиц золота наблюдался обратный эффект – при концентрации наночастиц 32 мкг/мл наблюдалось снижение сигнала на 50 %, а при концентрации 64 мкг/мл – полное подавление связывания моноклональных аутоантител с тиреоглобулином. Полимерные микросферы с диаметром близким к диаметру наночастиц серебра и золота не оказывали эффекта на связывание моноклональных аутоантител с тиреоглобулином.

Литература

1. Aijan R.A., Weetman A.P. *The Pathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis: Further Developments in our Understanding*// *Horm Metab Res.* 2015. Vol. 47. № 10. P. 702–710.
2. Поджарая К.С. Анализ методов получения наноразмерных частиц серебра// *Успехи в химии и химической технологии.* – 2012. – Т. 136, № 7. - С. 85-87.
3. Севастьянов А.В., Гарипов Р.М., Муратов И.И. Получение полистирол-полиольной суспензии в присутствии наночастиц на основе оксида кремния // *Вестник Казанского Технологического Университета.* – 2014. - Т. 17, № 10. - С. 86-89

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-182-184

STUDY OF INFLUENCE OF DIFFERENT NATURE CARRIERS ON IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF IMMOBILIZED THYROGLOBULIN MONOCLONAL AUTO ANTIBODIES

Stoinova A. ^{1*}, Zubkov A. ², Stanishevskiy Ya. ¹

¹ Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6 Miklukho-Maklaya st, Moscow, 117198, Russia

² Research Institute of Vaccines and Serums I. I. Mechnikov, Moscow, Russia

* e-mail: stoinova17@mail.ru

The modulating influence of nanocarriers of different nature (gold, silver, polymer microspheres) on immunological properties of monoclonal autoantibodies to the main protein of thyroid gland - thyroglobulin in the designed conjugate system "nanocarrier-antibodies" has been studied.

Key words. Nanoparticles, human thyroglobulin, nanocarriers, silver, gold, polystyrene, immunodiagnostics.

The study of autoimmune diseases of the thyroid gland is one of the urgent tasks of modern endocrinology [1]. Silver (AgNO₃) and gold (HAuCl₄) nanoparticles of silver (Ag) and gold (Au), 40 nm in size, were obtained by chemical recovery with tannin (pH=9) in the presence of a buffer solution of sodium tetraborate. [2].

Polystyrene microspheres with diameters of ~700 and 40 nm (St1 and St2) were synthesized by heterophase polymerization in the absence of surfactants. [3].

Immobilization of monoclonal autoantibodies with nanocarriers of different nature was carried out by physical adsorption by mixing antibodies MKAT 1. and MKAT 2. in the amount of 1.0 ml with 1.0 ml solution of nanoparticles, with concentrations of 2, 4, 8, 16, 32, 64 mg/ml.

The presence of binding of nanoparticles with monoclonal antibodies was confirmed by electrophoresis of proteins in the gel.

Immunological properties of monoclonal autoantibodies immobilized with nononoparticles of silver (Ag), gold (Au) and polymeric particles (St1, St2) were studied by immunoenzyme analysis (ELISA). (Fig 1, 2)

It was found that the use of silver and gold nanoparticles makes it possible to regulate the sensitivity of the immunoenzyme assay in order to increase or decrease the detection limit of autoantibodies to thyroglobulin for early detection of thyroid diseases in laboratory diagnostics and to create new generation diagnostic test systems. When using silver nanoparticles, a dose-dependent ELISA signal amplification effect of 100% is observed, with a maximum concentration of 32 µg/ml. For gold nanoparticles the opposite effect was observed - at the concentration of nanoparticles 32 µg/ml signal reduction by 50%, and at a concentration of 64 µg/ml - complete suppression of monoclonal autoantibodies binding with thyroglobulin. Polymer microspheres with diameters close to those of silver and gold nanoparticles had no effect on binding monoclonal autoantibodies to thyroglobulin.

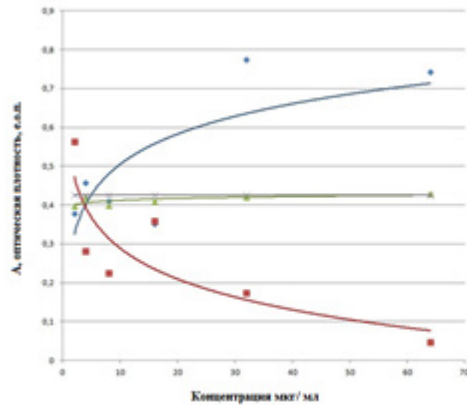


Fig. 1. The dependence of the intensity of ELISA on the concentration of nanoparticles (autoatom MKAT 2.)

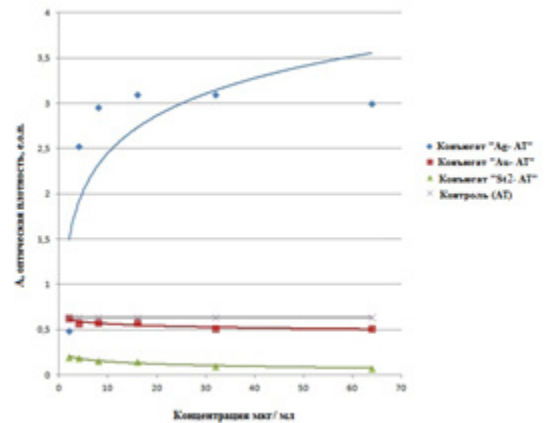


Fig. 2. The dependence of the intensity of the ELISA results on the concentration of nanoparticles (autoantibody MKAT 1.)

References

1. Aijan R.A., Weetman A.P. The Pathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis: Further Developments in our Understanding// *Horm Metab Res.* 2015. Vol. 47. № 10. P. 702–710.
2. Podzharaya K.S. Analysis of methods for producing nanosized particles of silver// *Advances in chemistry and chemical technology.* 2012. Vol. 136. № 7. P. 85-87.
3. Sevastyanov A.V., Garipov R.M., Muratov I.I. Obtaining a polystyrene-polyol suspension in the presence of silica-based nanoparticles// *Bulletin of Kazan Technological University.* 2014. Vol. 17. № 10. P. 86-89.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-184-186

ЭФФЕКТЫ ЭЛЕКТРОСУДОРОЖНОЙ СТИМУЛЯЦИИ В МОДЕЛИ 6-ОНДА-ИНДУЦИРОВАННОГО ГЕМИПАРКИНСОНИЗМА

Ушакова В.М.^{1,2}, Зоркина Я.А.¹, Зубков Е.А.¹, Морозова А.Ю.¹, Абрамова О.В.¹, Каримова О.С., Чехонин В.П.^{1,3}

¹ ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России, Москва, Россия
119034, Кропоткинский переулок, д. 23

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия
e-mail: ushakovavm@yandex.ru

Болезнь Паркинсона представляет собой вторую по распространенности нейродегенеративную патологию после болезни Альцгеймера, поражающую преимущественно лиц старшего возраста [1]. Начальным этапом развития болезни Паркинсона является продромальная фаза, на которой моторные нарушения еще не проявляются, но в большом числе случаев развиваются депрессивные расстройства.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, электросудорожная стимуляция, крысы, депрессия, леводопа

Для улучшения течения заболевания важно диагностировать и начинать терапию еще на ранней стадии. Стандартным методом лечения паркинсонизма является использование леводопы – предшественника дофамина, однако ее использование не всегда оказывается эффективным в лечении моторной симптоматики, и может даже усугублять эмоциональные проявления. Одним из методов терапии болезни является использование электросудорожной терапии [2], которая хорошо зарекомендовала себя в лечении депрессивных расстройств. Несмотря на то, что метод используется сравнительно давно, количество доклинических исследований в этой области остается сравнительно малым. В связи с этим, целью нашего исследования стало изучение эффектов электросудорожной стимуляции (ЭСС) на крысах с моделированным 6-ОНДА-гемипаркинсонизмом.

В работе использовались самцы крыс Wistar возрастом 2 месяца, разделенные на 5 групп: 1) группа контроля (n=8), 2) группа с экспериментальным гемипаркинсонизмом (БП) (n=9), 3) группа с гемипаркинсонизмом, получавшая леводопу (БП+Л) (n=9), 4) группа с гемипаркинсонизмом, получавшая ЭСС (БП+ЭСС)

(n=8), 5) группа с гемипаркинсонизмом, получавшая ЭСС и леводопу (БП+ЭСС+Л) (n=8). Для моделирования гемипаркинсонизма животным вводили 12 мкг 6-OHDA в 3 мкл раствора 0,05% аскорбиновой кислоты в область стриатума (AP:0,5, ML:2,7, DV:-5). Терапию проводили спустя полтора месяца после операции: леводопу применяли внутривенно 14 дней (50 мг/кг), ЭСС применяли в течение 10 дней (70 мА, 50 Гц, 500 мкс). Оценку поведения животных проводили в тестах кетамин-индуцированное вращение («Ротаметр»), «Предпочтение раствора сахарозы», «Принудительное плавание» и «Распознавание объекта».

При исследовании моторных нарушений в тесте «Ротаметр» статистически значимых изменений показано не было. Тем не менее, при исследовании депрессивно-подобного состояния животных были выявлены положительные эффекты ЭСС, выражавшиеся в существенном снижении длительности иммобильности ($p < 0,05$) – маркера депрессивных состояний крыс по сравнению с БП. Интересно отметить, что, при этом, у группы БП+Л подобных изменений не наблюдалось, а для группы БП+ЭСС+Л была показана только незначимая тенденция к снижению иммобильности ($p = 0,089$). Эти данные согласуются с полученными ранее результатами о продепрессивном действии леводопы [3]. Несмотря на полученные различия в тесте «Принудительное плавание», исследование ангедонии не показало межгрупповых различий, хотя индекс предпочтения сахарозы у группы, получавшей ЭСС, превышал значения у крыс БП. В ходе оценки когнитивных функций животных были получены значительные отличия в тесте «Распознавание объекта». Так, индекс дискриминации оперированных животных был существенно ниже, чем у крыс, получавших ЭСС: $p < 0,005$ по сравнению с БП+ЭСС, БП+ЭСС+Л. Таким образом, ЭСС может оказывать положительное влияние на когнитивные функции крыс с нейродегенерацией. Интересно отметить, что эти данные согласуются с результатами исследования влияния ЭСС на память крыс с экспериментальной депрессией, полученными ранее [4].

Таким образом, в работе показано, что ЭСС оказывает положительное действие на эмоциональные и когнитивные нарушения крыс, развивающиеся при нейродегенеративных процессах. Это может указывать на терапевтический потенциал электросудорожной терапии в лечении болезни Паркинсона. Тем не менее, оценка влияния ЭСС на моторные нарушения, являющиеся неотъемлемой частью развития экстрапирамидальных патологий, требует более подробного изучения и тщательного анализа.

Литература

1. Cacabelos R. *Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics*. *Int. J. Mol. Sci.* 2017 Vol. 18(3). doi: 10.3390/ijms18030551.
2. Narang P, Glowacki A, Lippmann S. *Electroconvulsive Therapy Intervention for Parkinson's Disease*. *Innov. Clin. Neurosci.* 2015. Vol. 12 (9-10). P. 25-28.
3. Каримова О.С., Морозова А.Ю., Зоркина Я.А., Зубков Е.А., Ушакова В.М., Абрамова О.В., Чехонин В.П. Продепрессивный эффект леводопы в модели 6-OHDA-индуцированного гемипаркинсонизма у крыс. *Альманах Клин. Мед.* 2020. Т. 48, №1, С. 22-33.
4. Ушакова В.М., Зубков Е.А., Морозова А.Ю., Горлова А.В., Павлов Д.А., Иноземцев А.Н., Чехонин В.П. Влияние электросудорожной терапии на крыс при депрессивно-подобном состоянии. *Бюл. Эксп. Биол. Мед.* 2017. Т. 163, №5, С. 549-552.

UDC 616.858-008.6 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-184-186

EFFECTS OF ELECTROCONVULSIVE STIMULATION IN RATS WITH 6-OHDA INDUCED HEMIPARKINSONISM

Ushakova V.M.^{1,2}, Zorkina Ya.A.¹, Zubkov E.A.¹, Morozova A.Yu.¹, Abramova O.V.¹, Karimova O.S., Chekhonin V.P.^{1,3}

¹ Serbsky Medical Research Center of Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia
119034, Kropotkinsky lane, 23

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia
e-mail: ushakovavm@yandex.ru

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative pathology after Alzheimer's disease, affecting mainly older people (1). The first stage of Parkinson's disease pathogenesis is the prodromal phase, which characterized by absence of motor impairments, but development of depression in numerous cases. To improve the course of the disease, it is important to diagnose and start treatment with early stage.

Key words: Parkinson's disease, electroconvulsive stimulation, rats, depression, L-Dopa

The standard method of treating parkinsonism is the administration of levodopa, a precursor of dopamine.

Nevertheless its use is not always effective in motor symptoms control; moreover it can even exacerbate emotional pathologies. One method of disease treatment is electroconvulsive therapy [2], which has proven its effectiveness in depressive disorders therapy. Although the method has been applied for a relatively long time, the number of preclinical studies in this area remains low. For this reason the aim of our research was to investigate the effects of electroconvulsive stimulation (ECS) in rats with 6-OHDA-induced hemiparkinsonism.

In our experiment we used male Wistar rats 2 months old divided into 5 groups: 1) control group (n=8), 2) experimental hemiparkinsonism group (PD) (n=9), 3) hemiparkinsonism group received levodopa (PD+L) (n=9), 4) hemiparkinsonism group received ECS (PD+ECS) (n=8), 5) hemiparkinsonism group received ECS and levodopa (PD+ECS+L) (n=8). To model hemiparkinsonism, animals were injected with 12 µg 6-OHDA in a 3 µl solution of 0.05% ascorbic acid. The injection was administrated into the striatum (AP:0,5, ML:2,7, DV:-5). The therapy was carried out one and a half months after the operation: levodopa was applied intragastrically for 14 days (50 mg/kg), ECS was used for 10 days (70 mA, 50 Hz, 500 µs). Behavior evaluation was performed via ketamine induced rotation tests ("Rotameter"), "Sucrose preference test", "Forced swimming test" and "Object recognition test".

No statistically significant changes were demonstrated for motor function in the Rotameter test. However, positive effects of ECS were found during the study of depression-like condition in animals. In particular, ECS application significantly reduced the duration of immobility ($p < 0.05$) - a marker of depressive state in rats. It is interesting to note that the group PD+L did not undergo such behavioral changes compared to PD, while the group BP+ESS+L demonstrated only a slight trend in immobility decrease ($p = 0.089$). These results are consistent with the previous data about the prodepressant effects of levodopa [3]. Despite the differences obtained in the Forced Swim test, the anhedonia test did not reveal any intergroup differences, although the sucrose preference index in the PD+ECS group was higher than in the PD group. Significant differences were obtained during the evaluation of the cognitive functions in the Object Recognition test. In particular, the discrimination index in PD animals was significantly lower than in rats received ECS: $p < 0.005$ compared to PD+ECS, PD+ECS+L. Thus, ECS can produce a therapeutic effect on the cognitive functions in rats with neurodegeneration. These data corroborates the previous results describing a memory improvement in depressed rats after ECS [4].

Thus, the research demonstrates the positive effect of ECS recoved the emotional and cognitive deficits in rats with neurodegeneration. This may indicate the therapeutic potential of electroconvulsive therapy in the treatment of Parkinson's disease. However, the assessment of ECS influence on motor impairments, which are an integral part of extrapyramidal pathologies, requires more detailed investigation and careful analysis.

References

1. Cacabelos R. Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. *Int. J. Mol. Sci.* 2017 Vol. 18(3). doi: 10.3390/ijms18030551.
2. Narang P, Glowacki A, Lippmann S. Electroconvulsive Therapy Intervention for Parkinson's Disease. *Innov. Clin. Neurosci.* 2015. Vol. 12 (9-10). P. 25-28.
3. Karimova O.S., Morozova A. Yu., Zorkina Ya. A., Zubkov E.A., Ushakova V.M., Abramova O.V., Chekhonin V.P. The pro-depressive effect of levodopa in a 6-OHDA-induced hemiparkinsonism rat model. *Alm. Clin. Med.* 2020. Vol. 48(1). P. 22-33.
4. Ushakova V.M., Zubkov E.A., Morozova A. Yu., Gorlova A.V., Pavlov D.A., Inozemtsev A.N., Chekhonin V.P. Effect of electroconvulsive therapy on cognitive function of rats with depression-like disorders induced by ultrasound exposure. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. Vol. 163(5). P. 549-552.

УДК 544.3.03: 544.032: 544.777 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-186-188

ВОДОРАСТВОРИМАЯ ПЕРРОРАЛЬНАЯ СИСТЕМА ДОСТАВКИ ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ НА ОСНОВЕ ИХ КОМПЛЕКСА С БИОПОЛИМЕРАМИ

Чеботарёв С.А.¹, Зеликина Д.В.¹, Комарова А.П.², Балакина Е.С.², Пальмина Н.П.¹, Богданова Н.Г.¹, Антипова А.С.¹, Мартиросова Е.И.¹, Семёнова М.Г.¹

¹ Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия. 119334 Москва, ул. Косыгина, д. 4. e-mail: sportsislive@gmail.com

² Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия. 125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9

Получена водорастворимая и наноразмерная перроральная система доставки эссенциальных липидов на основе их супрамолекулярных комплексов с биополимерами, которая обеспечивает высокую защиту липидов от окисления при хранении, а также – лёгкость введения их адекватных количеств в различные жидкие профилактические средства.

Ключевые слова: биологически активные липиды, липосомы, биополимеры, пероральные системы доставки, супрамолекулярные комплексы

По данным доказательной медицины такие эссенциальные липиды, как ω -3 и ω -6 полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), играют важную роль в здоровьесбережении человека, а именно: в поддержании в здоровом состоянии его сердечно-сосудистой системы, головного мозга, зрительных функций, нервной системы, а также - в снижении воспалительных процессов [1] При этом установлено, что для эффективного действия ω -3 и ω -6 ПНЖК их соотношение в профилактических средствах должно быть приближено к эквивалентному [2]. Таким образом, в настоящее время ставится задача разработки различных профилактических средств, содержащих адекватные количества биологически активных ω -3 и ω -6 ПНЖК, сохраняющих свою биологическую активность в процессах промышленного производства и при хранении, а также обладающих контролируемой биодоступностью и высокой степенью биоусвоения в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ). Одним из путей решения этой задачи может быть разработка водорастворимой пероральной системы доставки эссенциальных ПНЖК, которая должна защитить их от окисления кислородом воздуха и деградации, а также обеспечить им высокую растворимость и контролируемую биодоступность в водных средах биологических жидкостей ЖКТ, создавая условия для максимально-возможного биоусвоения.

В данной работе продемонстрирована возможность создания инновационной водорастворимой пероральной системы доставки эквивалентного количества ω -3 и ω -6 ПНЖК на основе супрамолекулярного комплекса липосом фосфатидилхолина (ФХ – гепатопротектор и источник ω -6 ПНЖК), обогащённых ω -3 α -линоленовой жирной кислотой (АЛК), с биополимерами: изолятом сывороточных белков молока (ИСБ – макронутриент, обладающий антиоксидантными свойствами [3]) и хитозаном (Хит -катионный мукоадгезивный полисахарид [4]). Было установлено, что комплекс (ИСБ : ХИТ : липосомы (ФХ-АЛК) = 1:1:1 (по массе)) характеризуется 100% растворимостью в водной среде при низкой ионной силе 0.001М в диапазоне pH от 4.5 до 6.5, включая ИЭТ белков (pH 5.1). По данным динамического, электрофоретического и статического многоугольного лазерного светорассеяния в основе этого результата лежат как абсолютная величина ζ -потенциала ≥ 30 мВ, так и наноразмеры (до 545 нм) комплексных частиц. Кроме того, обнаруженные высокие защитные способности комплекса по отношению к перекисному автоокислению липидов можно, главным образом, объяснить ярко выраженной ассоциацией биополимеров с липосомами (ФХ-АЛК) в комплексных частицах (например, при pH =5.1 наблюдался рост молярной массы: в 67 раз в сравнении с Хит и в 150 раз в сравнении с ИСБ; а рост плотности: в 12.8 раз в сравнении с Хит и в 14 раз в сравнении с ИСБ), что, очевидно, препятствовало диффузии кислорода к полиненасыщенным цепочкам ПНЖК. Этому же могло способствовать увеличение микровязкости бислоя липосом в комплексных частицах (на 47% в сравнении с несвязанными в комплекс с биополимерами липосомами (ФХ-АЛК)), определённое методом ЭПР. Работа С.А.Ч. и Д.В.З. была поддержана Российским Фондом Фундаментальных исследований (РФФИ), Грант 18-316-00111.

Литература

1. Cardoso C., Afonso C., Bandarra N. M. *Seafood lipids and cardiovascular health //Nutrire.* – 2016. – V. 41. – №. 1. – p.7.
2. Candela G.C., Bermejo López, L.M. & Loria K.V. *Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health: Nutritional recommendations// Nutricion Hospitalaria,* – 2011. – V. 26(2). – p. 323-329.
3. Liu, H. C., Chen, W. L., & Mao, S. J. T. *Antioxidant nature of bovine milk beta lactoglobulin// Journal of Dairy Science.* – 2007. – V.90. – p. 547–555.
4. Marcos Garcia-Fuentes, Maria J. Alonso. *Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand?// J Control Release* – 2012. – V. 161. – p. 496–504.

UDC: 544.3.03: 544.032: 544.777 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-186-188

WATER-SOLUBLE PERORAL DELIVERY SYSTEM OF ESSENTIAL LIPIDS BASED ON THEIR COMPLEX WITH BIOPOLYMERS

Chebotarev S.A.¹, Zelikina D.V.¹, Komarova A.P.², Balakina E.S.², Palmina N.P.¹, Bogdanova N.G.¹, Antipova A.S.¹, Martirosova E.I.¹, Semenova M.G.¹

¹ N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, Kosygin str.4, 119334 Moscow, Russian Federation; e-mail: sportsislive@gmail.com

² D. I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Miusskaya sq., 9, 125047 Moscow, Russian Federation

A water-soluble and nanoscale peroral system has been obtained for the delivery of essential lipids. It was based on the supramolecular complexes of the lipids with biopolymers. This system provides both the high protection

of lipids against oxidation during storage and the ease addition of their adequate amounts into various liquid prophylactic agents.

Key words: biologically active lipids, liposomes, biopolymers, oral delivery systems, supramolecular complexes

According to data of evidence-based medicine, such essential lipids as ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) play an important role in preserving human health. This is reflecting in maintaining a healthy state of cardiovascular system, brain, visual functions, nervous system, as well as in the reduction of inflammatory processes [1]. It was found that for the effective action of ω -3 and ω -6 PUFAs their ratio should be close to the equimass in prophylactic agents [2]. Thus, at present, the task is to develop various prophylactic agents containing adequate amounts of biologically active ω -3 and ω -6 PUFAs, retaining their biological activity both in industrial production processes and during storage, as well as possessing both controlled bioaccessibility and a high degree of bioavailability in the gastrointestinal tract (GIT). One of the ways to solve this problem can be the development of a water-soluble peroral system for the delivery of essential PUFAs, which should protect them from oxidation by atmospheric oxygen and degradation, and also provide them with high solubility and controlled bioaccessibility in aqueous media of biological fluids of the GIT, creating conditions for the maximum possible bioavailability.

This work demonstrates the possibility of creating an innovative water-soluble peroral system for the delivery of equimass amounts of ω -3 and ω -6 PUFAs based on a supramolecular complex consisting of phosphatidylcholine liposomes (PC is a hepatoprotector and a source of ω -6 PUFA) enriched with ω -3 α -linolenic fatty acid (ALA) and biopolymers (whey protein isolate (WPI) that is a macronutrient with antioxidant properties [3]) and chitosan (Chi) – a cationic mucoadhesive polysaccharide [4]). It was found that the complex (WPI : Chi : liposomes (PC-ALA) = 1: 1: 1 (by weight)) was characterized by 100% solubility in an aqueous medium at a low ionic strength of 0.001 M in the pH range from 4.5 to 6.5, including the isoelectric point of WPI (pH 5.1). According to the data of dynamic, electrophoretic, and static multi-angle laser light scattering, this result is based on both the absolute value of the ζ -potential (> 30 mV) and the nanosize (up to 545 nm) of the complex particles. In addition, the revealed high protective ability of the complex in relation to lipid peroxidation can be mainly attributable to the pronounced association of the biopolymers with the liposomes (PC-ALA) in them (for example, at pH = 5.1 that was reflected both in an increase in the biopolymer molar masses (Mw) and densities (d) in comparison with these parameters of the biopolymers alone by a factor of: 67 for Mw of Chi; 150 for Mw of WPI; 12.8 for d of Chi; 14 for d of WPI), that obviously, prevented the diffusion of oxygen to polyunsaturated PUFAs chains. This could also be facilitated by an increase in the microviscosity of the liposome bilayer in complex particles (by 47% in comparison with free liposomes determined by the EPR method. The work of Chebotarev S.A. and Zelikina D.V. was supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), Grant 18-316-00111.

References

1. Cardoso C., Afonso C., Bandarra N. M. *Seafood lipids and cardiovascular health* // *Nutrire.* – 2016. – V. 41. – №. 1. – p.7.
2. Candela G.C., Bermejo López, L.M. & Loria K.V. *Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health: Nutritional recommendations* // *Nutricion Hospitalaria,* – 2011. – V. 26(2). – p. 323-329.
3. Liu, H. C., Chen, W. L., & Mao, S. J. T. *Antioxidant nature of bovine milk betalactoglobulin* // *Journal of Dairy Science.* – 2007. – V.90. – p. 547–555.
4. Marcos Garcia-Fuentes, Maria J. Alonso. *Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand?* // *J Control Release* – 2012. – V. 161. – p. 496–504.

УДК 621.039.75 DOI 10.37747/2312-640X-220-18-188-189

РАЗРАБОТКА БЫСТРОГО ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО МЕТОДА ИММУНОБЛОТИНГА С МАГНИТНЫМИ МЕТКАМИ

Шляпников Ю.М., Канев И.Л., Малахова Е.М., Шляпникова Е.А.

ФГБНУ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г.Пушкино, Россия.
 142290, г.Пушкино, Московская область, ул. Институтская, 3.
 e-mail: yuri.shlyapnikov@gmail.com

Предложен новый ультрачувствительный метод иммуноблоттинга, основанный на проведении электрофореза между мембранами из регенерированной целлюлозы.

Ключевые слова: иммуноблоттинг, магнитные частицы, выдыхаемый воздух.

Хорошо известный метод Вестерн-блоттинга широко используется для обнаружения белков с использованием специфических антител. В данной работе разработан новый быстрый высокочувствительный метод иммуноблоттинга. Для этого электрофоретическое разделение белков проводится в неденатурирующих условиях в тонком проводящем слое между соприкасающимися гидрофильными целлюлозными мембранами. Предварительно дефекты поверхности диализной мембраны выравниваются осаждением слоя аморфной целлюлозы. Поверхность модифицируется азидофенильными группами для фотохимической иммобилизации белков *in situ* сразу после электрофореза. Таким образом, исключается дополнительная стадия переноса белка из геля на мембрану, используемая в Вестерн-блоте. Белковые полосы затем визуализируют с помощью магнитных частиц, покрытых специфическими антителами. Ключевыми преимуществами метода по сравнению с существующими являются высокая чувствительность, быстрота и низкое потребление антител: предел обнаружения составляет 0,1-0,3 фг или менее 10000 молекул в образце, что соответствует концентрации 10 фг/мл, при времени анализа ~5 мин и расходе антител в анализе 3 нг. Новый метод может быть использован для анализа сложных биологических образцов, содержащих следовые количества аналитов, когда чувствительность других методов анализа оказывается недостаточной. В качестве потенциального приложения для медицинской диагностики мы продемонстрировали обнаружение трёх биомаркеров, IL-1 β , общего IgA и IgA, специфичного к антигену *Mycobacterium tuberculosis*, в образцах выдыхаемого воздуха, полученных от больных туберкулёзом и здоровых добровольцев [1].

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-75-10025.

Литература

1. Shlyapnikov Y.M., Kanev I.L., Shlyapnikova E.A. *Rapid Ultrasensitive Gel-Free Immunoblotting with Magnetic Labels // Anal. Chem.* 2020. Doi: 10.1021/acs.analchem.0c00314.

UDC 621.039.75 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-188-189

DEVELOPMENT OF FAST HIGHLY SENSITIVE IMMUNOBLOTTING METHOD WITH MAGNETIC LABELS

Shlyapnikov Yu.M., Kanev I.L., Malakhova E.A., Shlyapnikova E.A.

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, 142290, Pushchino, Moscow Region, Institutskaya str., 3.
e-mail: yuri.shlyapnikov@gmail.com*

A new ultra-sensitive method of immunoblotting based on the electrophoresis between membranes from regenerated cellulose is proposed.

Key words: immunoblotting, magnetic labels, exhaled breath.

The well-known Western-blotting method is widely used to detect proteins using specific antibodies. In this work, a new rapid and highly sensitive method of immunoblotting is developed. For this, electrophoretic separation of proteins is carried out under non-denaturing conditions in a thin conducting layer between contacting hydrophilic cellulose membranes. The defects of the dialysis membrane surface are preliminarily cured by deposition of the cellulose layer. Azidophenyl groups are introduced onto the surface for photochemical immobilization of proteins *in situ* immediately after electrophoresis. This eliminates the step of transferring the protein from the gel onto the membrane, commonly used in Western blotting. Antibody-coated magnetic beads are used to visualize specific protein bands. The key advantages of the method compared to the existing ones are high sensitivity, speed and low antibody consumption: LOD is 0.1-0.3 fg or less than 10000 protein molecules per sample, which corresponds to 10 fg/ml, with an analysis time of ~5 min and an antibody consumption of 3 ng per assay. The new method can be used for the analysis of complex biological samples containing trace amounts of analytes, when the sensitivity of the available analysis methods is insufficient. As a potential application for medical diagnostics, we demonstrated the assay of three biomarkers, IL-1 β , total IgA and IgA specific for *Mycobacterium tuberculosis* antigen, in exhaled breath samples from tuberculosis patients and healthy volunteers [1].

This work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 19-75-10025.

References

1. Shlyapnikov Y.M., Kanev I.L., Shlyapnikova E.A. *Rapid Ultrasensitive Gel-Free Immunoblotting with Magnetic Labels // Anal. Chem.* 2020. Doi: 10.1021/acs.analchem.0c00314.

УДК 615.451.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-190-191

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО КООРДИНАЦИОННОГО СОЕДИНЕНИЯ МЕДИ

Якимова Т.М., Власова К.Ю., Красновская О.О., Клячко Н.Л.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1
 e-mail: yakimova_t31@inbox.ru

Для инкапсуляции в липосомы лекарственного препарата для лечения трижды негативного рака молочной железы, представляющего собой координационное соединение меди, была разработана методика загрузки. Полученная липосомальная суспензия стабильна в течение двух недель, загрузка комплекса подтверждается спектрофотометрически и количественно оценивается с помощью ВЭЖХ.

Ключевые слова: липосомы, координационное соединение меди, тройной негативный рак молочной железы, доставка лекарств

Медатион – это противоопухолевый препарат, представляющий собой координационное соединение меди на основе 2-алкилтиоимидазола. По результатам доклинических испытаний препарат рекомендован для лечения трижды негативных опухолей молочной железы. Однако существенным ограничением применения комплекса на практике является его гидрофобность и, как следствие, низкий уровень биодоступности. Одним из способов улучшения параметров растворимости и биодоступности гидрофобных активных молекул является их включение в “наноконтейнеры” для доставки лекарств. Наиболее изученной и используемой системой для доставки биологически активных веществ являются липосомы. Гидрофобность медного комплекса не позволяет использовать для его загрузки в липосомы привычные для гидрофильных веществ способы, потому цель данной работы – поиск оптимального метода инкапсуляции координационного соединения меди в липосомы.

В литературе описана технология Метаплекс, позволяющая осуществлять синтез органических комплексов с медью внутри липосом. Основная идея подхода заключается в формировании комплекса в гидрофильной области липосом: порошок органического лиганда добавляется к предварительно приготовленной суспензии липосом с медной солью внутри, затем лиганд проникает через липидный бислой и начинается процесс комплексообразования. Технология имеет достаточно подробное описание в литературе, потому её воспроизведение было определено приоритетной задачей.

Для воспроизведения технологии были приготовлены липосомы из дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC), холестерина (Chol) и ПЭГ-дистеароилфосфоэтаноламина (DSPE-PEG(2000)) состава DPPC:Chol:DSPE-PEG(2000) 55:40:5. Липосомы получали методом гидратации липидной пленки раствором хлорида меди, затем полученную суспензию экструдировали до получения частиц размером 110 нм. Эффективность загрузки составила 0,1 для меди и 0,05 для лиганда (мольное отношение меди и лиганда к липидам). Однако нами были выявлены существенные недостатки технологии, такие как большие потери лиганда и меди в процессе загрузки и сложность очистки итоговой суспензии от незагрузившихся веществ. Мы оптимизировали технологию Метаплекс для дополнительной очистки суспензии, тем не менее, использование технологии для инкапсуляции Медатиона остается неоптимальным.

Нам удалось успешно применить для загрузки комплекса альтернативную методику, основанную на методе этанольной инъекции. Методика реализуется путем приготовления растворов лиганда в ацетонитриле и липидов в метаноле, затем их совместной инъекции при быстром перемешивании в 300 мМ раствор CuCl_2 , нагретый до 75°C. Из полученной однофазной системы органические растворители отгонялись при температуре 45°C, при этом в водном растворе происходило формирование липосом с комплексом внутри, затем суспензию экструдировали и очищали от незагрузившейся меди. Данный подход позволил нам получить суспензию, стабильную до двух недель, а также существенно уменьшить расход лиганда в процессе получения образца. Присутствие комплекса в липосомах можно определить с помощью спектра поглощения, количественное определение лиганда можно осуществить с помощью ВЭЖХ. Предполагается, что данная методика является более подходящей для загрузки Медатиона, чем технология Метаплекс, поскольку она позволяет существенно увеличить стабильность суспензии, что принципиально важно для применения данной системы при внутривенном введении.

Эта работа частично поддержана грантами РФФИ 17-54-33027, 18-29-09154 и РНФ 19-74-10059, темой Гос. Регистрации АААА-А16-116052010081-5, Программой развития МГУ

UDC 615.451.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-190-191

ENCAPSULATION OF ANTITUMOR COPPER COMPLEX INTO LIPOSOMES

Yakimova T.M., Vlasova K. Yu., Krasnovskaya O.O., Klyachko N.L.

*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119991, Moscow, Leninskie Gory, GSP-1
e-mail: yakimova_t31@inbox.ru*

To encapsulate a new copper coordination compound drug for triple-negative breast cancer treatment we have developed a new approach. The obtained liposomal suspension is stable up to 2 weeks; successful complex loading is confirmed spectrophotometrically and can be quantified by HPLC.

Key words: liposomes, copper coordination compound, triple-negative breast cancer, drug delivery

Medation is an antitumor drug classified as a copper complex compound of organic ligands containing 2-alkylthioimidazol. According to the results of pre-clinical trials, the drug is recommended for Triple-Negative Breast Cancer treatment. Nevertheless, a significant limitation for in vivo use of this complex is its hydrophobic properties and, as a result, a low level of bioavailability. One of the ways to increase bioavailability of hydrophobic substances is their encapsulation into drug delivery systems. Liposomes are the most studied and well-described systems for biological substances delivery. Hydrophobic properties of our coordination compound do not allow us to use typical ways of encapsulation. Thus, the main aim of our work is to investigate for an optimal method for encapsulation of copper coordination compound into liposomes.

Previous studies have reported the technology called Metaplex, which allows to provide metal complex synthesis inside liposomes. The key idea of this approach is to form the complex inside a hydrophilic volume of a liposome, the ligand powder is added to the previously prepared liposome suspension loaded with copper salt and then the process of loading of an organic ligand through the bilayer and complex formation start. Due to the detailed technology description, we have identified its' reproducibility as a priority.

For Metaplex approach reproducibility liposomes were prepared from dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), cholesterol (Chol) and PEG-distearoylphosphoethanolamine (DSPE-PEG(2000)) in the ratio DPPC:Cholesterol:DSPE-PEG (2000) 55:40:5. Liposomes were prepared by thin film rehydration with 300 mM CuCl_2 solution and then were extruded through polycarbonate membrane until the final particle size of 110 nm. The loading efficiency for copper was 0.1 (molar ratio of copper to lipids) and 0.05 for ligand (molar ratio of ligand to lipids). However, significant Metaplex approach disadvantages were identified, such as a large loss of copper and ligand during encapsulation, which is accompanied by a complicated purification process of the final suspension. We have optimized Metaplex technology for an effective purification; nevertheless, Metaplex application for Medation encapsulation remains not optimal.

We have succeeded in applying an alternative technique based on ethanol injection method for complex encapsulation. This technique involves preparation of solutions of the ligand in acetonitrile and lipids in methanol, then their mixing and injection into 300 mM CuCl_2 solution heated up to 75°C with vigorous stirring. From the resulting single-phase system organic solvents were distilled at a temperature of 45°C to form liposomes containing the complex inside, then the suspension was extruded and purified from unencapsulated copper. This approach allowed us to obtain a suspension, which was stable up to 2 weeks, and to reduce the ligand consumption significantly. The presence of complex in liposomes has been proven by absorption spectra, quantitative analysis of ligand can be performed by HPLC. We consider this new technique to be more promising for Medation encapsulation than Metaplex approach as it has already shown an increase of stability time, which is of great importance for intravenous injections.

This work was supported by RFBR grants 17-54-33027, 18-29-09154 and RSF 19-74-10059, State Topic AAA-A-16-116052010081-5, MSU Program of Development

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

Руководители

И.В. Красильников д.б.н., профессор, зам. директора по инновациям и международным отношениям ФГУП Санкт-Петербургский Научно-Исследовательский Институт Вакцин и Сывороток ФМБА России /

I.V. Krasilnikov grand PhD (Biology), professor, deputy director for Innovations and International Relations, FGUP SPbNIIVS, Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg

А.С. Симбирцев профессор, д.м.н., член-корреспондент РАН, ФГУП «Государственный НИИ особо чистых био-препаратов ФМБА России»/

A.S. Symbirtsev, corresponding member of RAS, professor, doctor of science (Medicine), State Institute of Highly Pure Biochemicals FMBA Russia

1. ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНАЛОГОВ БАКТЕРИОЦИНОВ

Антошина Д.В., Овчинникова Т.В., Баладин С.В. 194
 RECOMBINANT EXPRESSION OF NOVEL BACTERIOCIN ANALOGUES Antoshina D.V., Ovchinnikova T.V., Balandin S.V. ... 194

2. НОВЫЙ УНИВЕРСАЛЬНЫЙ АНТИГЕН ДЛЯ ВАКЦИНЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ПРОТИВ РОТАВИРУСА

Баранов О.А., Евтушенко Е.А., Рябчевская Е.М., Скурат Е.В., Иванов П.А., Кондакова О.А.,
 Никитин Н.А., Карпова О.В. 195
 A PROMISING UNIVERSAL ANTIGEN FOR THE NEW GENERATION VACCINE AGAINST ROTAVIRUS
 Baranov O.A., Evtushenko E.A., Ryabchevskaya E.M., Skurat E.V., Ivanov P.A., Kondakova O.A.,
 Nikitin N.A., Karpova O.V. 196

3. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ДВУМ ПРОИЗВОДНЫМ МОРФИНА В ВИДЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ВАКЦИНЫ ОТ ОПИАТНОЙ ЗАВИСИМОСТИ

Берзина А.Г., Агельдинов Р.А., Нестеров М.С., Климова Т.А., Гамалея Н.Б., Ульянова Л.И. 198
 PROSPECTS OF USING ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES TO TWO MORPHINE DERIVATIVES IN THE FORM
 OF LIPOSOMAL FORM FOR THE DEVELOPMENT OF A VACCINE AGAINST OPIATE ADDICTION
 Berzina A.G., Ageldinov R.A., Nesterov M.S., Klimova T.A., Gamaleya N.B., Ulyanova L.I. 199

4. РАЗРАБОТКА СТАБИЛЬНОГО АНТИГЕНА СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ДЛЯ ВАКЦИНЫ

НА ОСНОВЕ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ Д. Л. Грановский, Е. М. Рябчевская, Е. А. Евтушенко, Н. А. Никитин,
 О. А. Кондакова, П. А. Иванов, О. В. Карпова 200
 DEVELOPMENT OF STABLE ANTHRAX ANTIGEN FOR PLANT VIRUS-BASED VACCINE
 D. L. Granovskiy, E. M. Ryabchevskaya, E. A. Evtushenko, N. A. Nikitin, O. A. Kondakova, P. A. Ivanov, O. V. Karpova 201

5. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК 4647 И ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ НА ПРИБОРЕ ICELLIS NANO

Думченко Н.Б. 202
 CULTIVATION OF CELLS 4647 AND THE PERSPECTIVE VIRUS IN THE ICELLIS NANO BIORACTOR
 Dumchenko N.B. 204

6. СОЕДИНЕНИЯ, ОБЛАДАЮЩИЕ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ EX VIVO, КАК ВОЗМОЖНЫЕ АДЪЮВАНТЫ ДЛЯ ГЕННОИНЖЕНЕРНЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН

Масалова О.В., Леснова Е.И., Пермякова К.Ю., Пронин А.В. 205
 COMPOUNDS HAVING THE IMMUNOSTIMULATING ACTIVITY EX VIVO, AS POSSIBLE ADJUVANTS
 FOR GENETICALLY ENGINEERED ANTIVIRAL VACCINES
 Masalova O.V., Lesnova E.I., Permyakova K.Yu., Pronin A.V. 206

7. ОЦЕНКА ИММУНОКОРРЕГИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА RHALLUS IMPUDICUS ПО ИЗМЕНЕНИЮ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНОВ ЖИВОТНЫХ Разин А.Н., Волков М.Ю. 207

| | |
|---|-----|
| EVALUATION OF THE IMMUNOCORRECTIVE EFFECT OF VESELKA ON CHANGES IN IMMUNOCOMPETENT ORGANS OF ANIMALS Razin A. N., Volkov M. Yu. | 208 |
| 8. НОВЫЕ β -ШПИЛЕЧНЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ИЗ МОРСКИХ ПОЛИХЕТ Сафронова В.Н., Пантелеев П.В., Болосов И.А., Сычев С.В., Овчинникова Т.В. | 209 |
| NOVEL β -HAIRPIN ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM MARINE POLYCHAETA V.N. Safronova, P.V. Panteleev, I.A. Bolosov, S.V. Sychev, T.V. Ovchinnikova | 210 |
| 9. ИММУНОГЕННЫЕ И ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО КАСSETУ ГЕНОВ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА МАРБУРГ А.В.Семенова, Г.Ф.Сиволобова, А.А.Гражданцева, С.А.Пьянков, О.С.Таранов, О.В.Пьянков, Г.В.Кочнева | 210 |
| IMMUNOGENIC AND PROTECTIVE PROPERTIES OF RECOMBINANT VACCINIA VIRUS STRAIN, EXPRESSING GENE CASSETTE OF MARBURG VIRUS STRUCTURAL PROTEINS A.Semenova, G.Sivolobova, A.Grazhdantseva, S.P'yankov, O.Taranov, O.P'yankov, G.Kochneva | 211 |
| 10. ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФТОРХИНОЛОНОВ НА ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ Скuredина А.А., Копнова Т.Ю., Якупова Л.Р., Ле-Дейген И.М., Кудряшова Е.В. | 212 |
| INFLUENCE OF PHYSICAL-CHEMICAL PROPERTIES OF FLUOROQUINOLONES ON THEIR INTERACTION WITH HUMAN SERUM ALBUMIN Skuredina A. A., Kopnova T. Y., Yakupova L. R., Le-Deygen I. M., Kudryashova E. V. | 213 |
| 11. СПОСОБНОСТЬ НОВОГО ИММУНОСТИМУЛЯТОРА SAPOMAX СТИМУЛИРОВАТЬ СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ К ГЕННОИНЖЕНЕРНЫМ БЕЛКАМ ГЕПАТИТА Богоявленский А.П., Турмагамбетова А.С., Алексюк М.С., Алексюк П.Г., Соколова Н.С., Зайцева И.А., Березин В.Э. | 214 |
| ABILITY OF THE NEW IMMUNOSTIMULATOR SAPOMAX TO STIMULATE A SPECIFIC IMMUNE RESPONSE TO GENE-ENGINEERED PROTEINS OF HEPATITIS Bogoyavlenskiy A.P., Turmagambetova A.S., Alexyuk M.S., Alexyuk P.G., Sokolova N.S., Zaitseva I.A., Berezin V.E. | 215 |
| 12. СПОСОБНОСТЬ ФЕНОЛЬНЫХ КИСЛОТ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЗАЩИЩАТЬ ОРГАНИЗМ ОТ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ Турмагамбетова А.С., Богоявленский А.П., Алексюк П.Г., Соколова Н.С., Зайцева И.А., Березин В.Э. | 216 |
| THE ABILITY OF PHENOLIC ACIDS OF PLANT ORIGIN TO PROTECT THE ORGANISM FROM INFLUENZA INFECTION Turmagambetova A.S., Bogoyavlenskiy A.P., Alexyuk P.G., Sokolova N.S., Zaitseva I.A., Berezin V.E. | 217 |
| 13. СТИМУЛЯЦИЯ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ ОБЩЕГО ПРОТИВОВИРУСНОГО ИММУНИТЕТА КОМПЛЕКСНЫМ РАСТИТЕЛЬНОМ ПРЕПАРАТОМ Турмагамбетова А.С., Богоявленский А.П., Алексюк М.С., Омиртаева Э.С., Аканова К.С., Березин В.Э. | 218 |
| STIMULATION OF SOME GENES OF GENERAL ANTI-VIRAL IMMUNITY BY COMPLEX PLANT PREPARATION Turmagambetova A.S., Bogoyavlenskiy A.P., Alexyuk M.S., Omirtaeva E.S., Akanova K.S., Berezin V.E. | 219 |
| 14. ЗАВИСИМОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФУНГИЦИДНЫХ ПРОТРАВИТЕЛЕЙ ОТ РАЗМЕРА ЧАСТИЦ В ПРЕПАРАТАХ Улыбина О.В., Елиневская Л.С., Павлов В.А., Киенская К.И., Кусков А.Н. | 220 |
| DEPENDENCE OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF FUNGICID FOR SEED TREATMENT ON PARTICLE SIZE Ulybina O.V., Elinevskaya L.S., Pavlov V.A., Kienskaya K.I., Kuskov A.N. | 221 |
| 15. УЛЬТРАЗВУКОВАЯ ПРЕДОБРАБОТКА СУСПЕНЗИИ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИГЕНСОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ Устинова В.А., Ключкина В.И., Анисина О.В. | 222 |
| ULTRASONIC PROCESSING OF RABIES VIRUS SUSPENSION FOR OBTAINING ANTIGEN-CONTAINING PREPARATIONS FOR DIAGNOSTIC TEST SYSTEMS Ustinova V.A., Klyukina V.I., Anisina O.V. | 223 |

УДК 615.331 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-194-195

ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНАЛОГОВ БАКТЕРИОЦИНОВ

Антошина Д.В., Овчинникова Т.В., Баландин С.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академик-
 ков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия
 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10
 e-mail: riruka11@mail.ru

В работе исследована взаимосвязь структурных особенностей новых аналогов бактериоцинов и спектра их антимикробной активности.

Ключевые слова: лекарственная устойчивость, антимикробные пептиды, бактериоцины, лантибиотики.

Интерес к изучению антимикробных пептидов бактериального происхождения (бактериоцинов) связан с возможностью их применения в качестве новых антибиотиков и консервантов в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. Исследование механизмов селективного действия бактериоцинов открывает путь для разработки лекарственных средств, которые избирательно действуют на патогенные микроорганизмы и не подавляют жизнедеятельность нормальной микрофлоры, колонизирующей организм человека. Высокая селективность действия является ключевой в решении проблемы дисбактериоза и в сокращении риска развития кросс-резистентности к антимикробным агентам других классов. Одна из наиболее многочисленных групп бактериоцинов – лантибиотики, или бактериоцины класса Ia, – это пептиды, содержащие внутримолекулярные тиоэфирные связи, которые образуются в процессе посттрансляционной модификации остатков Ser/Thr и Cys, катализируемой специализированными семействами модифицирующих ферментов. Лантибиотики привлекают внимание благодаря их высокой активности в отношении грамположительных бактерий, включая многие резистентные патогены, такие, как метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA) и ванкомицин-резистентные *Enterococci* (VRE), а также из-за их низкой токсичности для человека.

Объекты нашей работы – это новые рекомбинантные аналоги двухкомпонентного лантибиотика лихеницидина, продуцируемого бактериями *Bacillus licheniformis*. Для получения данных пептидов мы разработали гетерологическую систему их экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Целью нашей работы являлось исследование взаимосвязи структурных особенностей новых аналогов бактериоцинов и спектра их антимикробной активности.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00369 А.

UDC 615.331 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-194-195

RECOMBINANT EXPRESSION OF NOVEL BACTERIOCIN ANALOGUES

Antoshina D.V., Ovchinnikova T.V., Balandin S.V.

Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Russia, Moscow
 117997, Moscow, Ul. Miklukho-Maklaya, 16/10
 e-mail: riruka11@mail.ru

In this work we investigated relationship between structural features of novel bacteriocin analogues and the spectrum of their antimicrobial activity.

Key words: multidrug resistance, antimicrobial peptides, bacteriocins, lantibiotics.

Interest in antimicrobial peptides of bacterial origin (bacteriocins) is associated with the potential for their use in medicine, veterinary, and the food industry as new antibiotics and preservatives. Investigation of mechanisms of selective action of bacteriocins opens the way for the development of drugs that selectively act on pathogenic microorganisms and do not suppress the vital activity of normal microbiota colonizing the human body. High selectivity of action is the key to solving the problem of dysbiosis and reducing the risk of developing cross-resistance to antimicrobial agents of other classes. One of the most numerous groups of bacteriocins – lantibiotics, or class Ia bacteriocins, – are the peptides containing intramolecular thioether bonds which are formed via post-

translational modifications of Ser/Thr and Cys residues catalyzed by several families of lantibiotic-modifying enzymes. Lantibiotics attract attention due to their high activity against Gram-positive bacteria, including many drug resistant pathogens such as methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin resistant *Enterococci* (VRE), as well as due to their low toxicity for humans.

The objects of our study are novel recombinant analogues of two-component lantibiotic *lichenicidin* produced by *Bacillus licheniformis*. We developed a heterologous *Escherichia coli*-based expression system to obtain these peptides. The aim of our work was to study relationship between structural features of novel bacteriocin analogues and the spectrum of their antimicrobial activity.

The work was supported by RFBR, project number 20-015-00369.

УДК 578.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-195-197

НОВЫЙ УНИВЕРСАЛЬНЫЙ АНТИГЕН ДЛЯ ВАКЦИНЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ПРОТИВ РОТАВИРУСА

Баранов О.А., Евтушенко Е.А., Рябчевская Е.М., Скурат Е.В., Иванов П.А., Кондакова О.А., Никитин Н.А., Карпова О.В.

Кафедра вирусологии, Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
119234, Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: obaranovmsu@gmail.com

Настоящая работа посвящена созданию рекомбинантного антигена для прототипа вакцины против широкого спектра штаммов ротавируса. Антиген VP8+875x6 создан на основе белка VP8 и включает ряд нейтрализующих эпитопов ротавирусных белков VP8, VP5 и VP7.

Ключевые слова: ротавирусная инфекция, вакцина, рекомбинантный антиген, адъювант, вирус табачной мозаики, сферические частицы.

Ротавирусная инфекция (РВИ) - опасное инфекционное заболевание. Ежегодно регистрируется около 215 тысяч летальных исходов среди детского населения от РВИ, что вносит ощутимый вклад в уровень детской смертности [1]. В настоящее время для профилактики РВИ применяются живые аттенуированные вакцины, однако с их использованием сопряжен ряд побочных эффектов. В связи с этим актуальной задачей является разработка безопасной рекомбинантной вакцины против ротавируса (РВ).

Белки капсида ротавируса VP4 и VP7 являются главными мишенями вируснейтрализующих антител [2, 3]. Под действием трипсина белок VP4 расщепляется на два домена VP8 и VP5. С каждым из этих доменов способны взаимодействовать специфические антитела, что может вносить существенный вклад в подавление ранней инфекции. Разработка эффективной вакцины на основе этих белков осложняется их значительной вариабельностью для различных штаммов. Возможным способом решения этой проблемы является одновременное включение нескольких ротавирусных эпитопов в вакцинный препарат.

Настоящая работа посвящена созданию рекомбинантного антигена (рАГ) для прототипа современной вакцины против РВ. В качестве основы для рАГ была выбрана часть последовательности VP8 (далее - ΔVP8) (65-223 аминокислотные остатки (а.о.) генотипа P8 (наиболее распространенный генотип РВ в настоящее время). ΔVP8 уже использовали как антиген для кандидатной вакцины против РВ, которая продемонстрировала высокую безопасность и иммуногенность [4]. В качестве дополнительных эпитопов были выбраны следующие консервативные антигенные детерминанты: эпитоп **MASLIYRQLL** белка VP8 (1-10 а.о.) - высококонсервативен для штаммов тринадцати Р-генотипов РВ группы А, идентичность > 95%; эпитоп **MKYDQNLLELDM** белка VP7 (142-152 а. о.), консервативен для штаммов РВ наиболее распространенного в мире генотипа G1, идентичность > 85%; и эпитоп **KAANYQYNLRDGEQVTA** белка VP5 (296-313 а. о.), консервативен для штаммов РВ самого распространенного в мире генотипа P8, идентичность > 90%. [3, 5, 6, 7]. Таким образом, данный набор антигенных участков РВ может позволить получить универсальный рАГ РВ.

В ходе настоящей работы была создана генетическая конструкция, кодирующая белок VP8+875x6, включающий укороченный домен ΔVP8 и 6 повторов выбранных нейтрализующих эпитопов белков VP8, VP7 и VP5. Рекомбинантный белок VP8+875x6 с молекулярной массой около 48кДа был экспрессирован в культуре бактериальных клеток и очищен. Методом ИФА мы показали, что с VP8+875x6 связываются антитела против рекомбинантного ΔVP8 генотипа P8, а также антитела против рекомбинантного ΔVP8 генотипа P4.

Для индукции эффективного иммунного ответа в настоящей работе в качестве безопасной платформы-адьюванта были выбраны сферические частицы (СЧ), образующиеся при термической перестройке вируса табачной мозаики [8]. С помощью метода флуоресцентной микроскопии было показано формирование комплексов СЧ с флуоресцентно меченым белком VP8+875x6. Антигенная специфичность рАГ в составе комплекса СЧ-VP8+875x6 была продемонстрирована с помощью метода иммунофлуоресценции и первичных антител против рекомбинантного ΔVP8 генотипа Р8.

Таким образом, комплексы СЧ с VP8+875x6 можно рассматривать как прототип вакцины нового поколения, которая потенциально может быть эффективной против различных штаммов ротавируса за счет разнообразия эпитопов в составе рекомбинантного антигена.

Работа частично поддержана АО «Нацимбио» и грантом РФФИ 20-016-00063 А.

Литература

1. Tate J.E., Burton A.H., Boschi-Pinto C., Parashar U.D., Agocs M., Serhan F., de Oliveira L., Mwenda J.M., Mihigo R. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children < 5 years of age, 2000–2013 // *Clinical Infectious Diseases*. 2016. V. 62. №. suppl_2. P. S96-S105
2. Padilla-Noriega L., Dunn S.J., Lopes S., Greenberg H.B., Arias C.F. Identification of two independent neutralization domains on the VP4 trypsin cleavage products VP5* and VP8* of human rotavirus ST3 // *Virology*. 1995. T. 206. №. 1. P. 148-154.
3. Coulson B.S., Kirkwood C. Relation of VP7 amino acid sequence to monoclonal antibody neutralization of rotavirus and rotavirus monotype // *Journal of virology*. 1991. V. 65. №. 11. P. 5968-5974.
4. Fix A.D., Harro C., McNeal M., Dally L., Flores J., Robertson G., Boslego J.W., Cryz S. Safety and immunogenicity of a parenterally administered rotavirus VP8 subunit vaccine in healthy adults // *Vaccine*. 2015. V. 33. №. 31. P. 3766-3772.
5. Kovacs-Nolan J., Mine Y. Tandem copies of a human rotavirus VP8 epitope can induce specific neutralizing antibodies in BALB/c mice // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2006. V. 1760. №. 12. P. 1884-1893.
6. Fleming F.E., Graham K.L., Taniguchi K., Takada Y., Coulson B.S. Rotavirus-neutralizing antibodies inhibit virus binding to integrins α2β1 and α4β1 // *Archives of virology*. 2007. V. 152. №. 6. P. 1087-1101.
7. Nair N., Feng N., Blum L.K., Sanyal M., Ding S., Jiang B., Sen A., Morton J.M., He X., Robinson H., Greenberg H.B. VP4- and VP7-specific antibodies mediate heterotypic immunity to rotavirus in humans // *Science translational medicine*. 2017. V. 9. №. 395. C. eaam5434.
8. Nikitin N.A., Zenin V.A., Trifonova E.A., Ryabchevskaya E.M., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Assessment of structurally modified plant virus as a novel adjuvant in toxicity studies // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2018. V. 97. P. 127–133.

UDC578.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-195-197

A PROMISING UNIVERSAL ANTIGEN FOR THE NEW GENERATION VACCINE AGAINST ROTAVIRUS

Baranov O.A., Evtushenko E.A., Ryabchevskaya E.M., Skurat E.V., Ivanov P.A., Kondakova O.A., Nikitin N.A., Karpova O.V.

Department of Virology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
 119234, Moscow, Leninskie Gory, house 1, building 12
 e-mail: obaranovmsu@gmail.com

The present work is concerned with development of recombinant antigen for the vaccine prototype. The vaccine is going to be effective against a wide range of rotaviruses. Antigen VP8+875x6 was developed on the basis of VP8 protein. It also includes several neutralizing epitopes from rotaviral proteins VP8, VP5 and VP7.

Key words: rotavirus infection, vaccine, recombinant antigen, adjuvant, tobacco mosaic virus, spherical particles.

Rotavirus infection (RVI) is a dangerous disease. Approximately 215 thousand infant deaths caused by RVI are detected annually. Thus, RVI is an important factor of child mortality [1]. Live attenuated vaccines are currently applied for RVI prevention. However, application of these vaccines may lead to a number of negative side effects. The development of a safe recombinant vaccine is thereby an urgent task.

Several studies demonstrate that VP4 and VP7 proteins of the rotavirus exterior capsid are the main targets of virus-neutralizing antibodies [2, 3]. In humans VP4 is cleaved by trypsin, forming separate domains VP8 and VP5. Each domain may interact with specific antibodies, which may lead to early infection suppression. However, the development of an effective recombinant vaccine is complicated by variation of these proteins in different rotavirus strains. The simultaneous use of several rotavirus epitopes may be a possible way to increase the efficiency of the vaccine.

The present work is concerned with development of recombinant antigen (rAG) for the modern vaccine prototype. The vaccine is going to be effective against a wide range of rotaviruses. The shortened sequence of VP8 (Δ VP8) (65-223 amino acid residues) of P8 genotype was selected as the basis for the rAG. Δ VP8 has already demonstrated high level of safety and immunogenicity when used as an antigen for candidate vaccine against rotavirus [4]. As additional epitopes the following conservative antigen determinants were selected: epitope **MASLIYRQLL** from protein VP8 genotype P8 (1-10 amino acid residues) – highly conservative epitope across thirteen P-genotypes of human rotavirus A, identity > 95% ; epitope **MKYDQNLLEDM** from protein VP7 (142-152 amino acid residues), conservative across rotavirus strains of the most common in the world genotype G1, identity > 85%; and epitope **KAANYQYNYLRDGEQVTA** from protein VP5 (296-313 amino acid residues), conservative across rotavirus strains of the most common in the world genotype P8, identity > 90% [3, 5, 6, 7]. Thus, the universal rotavirus rAG may be obtained by selecting this set of antigen regions.

We have obtained the genetic structure, coding VP8+875x6 protein. The protein contains Δ VP8 domain and 6 repeats of each above-mentioned neutralizing epitopes of VP8, VP7 and VP5 proteins.

The recombinant protein (MW 48kDa) was expressed in culture of E.coli and purified. With ELISA we demonstrated that antibodies against recombinant Δ VP8 genotype P8 bind with VP8+875x6. The same results were obtained for antibodies against recombinant Δ VP8 genotype P4.

In order to achieve an effective immune response, spherical particles (SPs) were chosen as safe adjuvant platform for the present work. SPs are formed by thermal remodelling of tobacco mosaic virus [8]. The formation of complexes of SPs and fluorescently labeled VP8+875x6 was detected by fluorescence microscopy. With immunofluorescence using primary antibodies against recombinant Δ VP8 genotype P8 we demonstrated the antigenic specificity of rAG as part of the SP-VP8+875x6 complex.

Thus, the SP-VP8+875x6 complexes can be viewed as the new generation vaccine prototype. The vaccine contains a variety of epitopes within the recombinant antigen and therefore it has the potential to be effective against various rotavirus strains.

This work was partially supported by National Immunobiological company and RFBR (grant 20-016-00063 A).

References

1. Tate J.E., Burton A.H., Boschi-Pinto C., Parashar U.D., Agocs M., Serhan F., de Oliveira L., Mwenda J.M., Mihigo R. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children < 5 years of age, 2000–2013 // *Clinical Infectious Diseases*. 2016. V. 62. №. suppl_2. P. S96-S105
2. Padilla-Noriega L., Dunn S.J., Lopes S., Greenberg H.B., Arias C.F. Identification of two independent neutralization domains on the VP4 trypsin cleavage products VP5* and VP8* of human rotavirus ST3 // *Virology*. 1995. T. 206. №. 1. P. 148-154.
3. Coulson B.S., Kirkwood C. Relation of VP7 amino acid sequence to monoclonal antibody neutralization of rotavirus and rotavirus monotype // *Journal of virology*. 1991. V. 65. №. 11. P. 5968-5974.
4. Fix A.D., Harro C., McNeal M., Dally L., Flores J., Robertson G., Boslego J.W., Cryz S. Safety and immunogenicity of a parenterally administered rotavirus VP8 subunit vaccine in healthy adults // *Vaccine*. 2015. V. 33. №. 31. P. 3766-3772.
5. Kovacs-Nolan J., Mine Y. Tandem copies of a human rotavirus VP8 epitope can induce specific neutralizing antibodies in BALB/c mice // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2006. V. 1760. №. 12. P. 1884-1893.
6. Fleming F.E., Graham K.L., Taniguchi K., Takada Y., Coulson B.S. Rotavirus-neutralizing antibodies inhibit virus binding to integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ // *Archives of virology*. 2007. V. 152. №. 6. P. 1087-1101.
7. Nair N., Feng N., Blum L.K., Sanyal M., Ding S., Jiang B., Sen A., Morton J.M., He X., Robinson H., Greenberg H.B. VP4- and VP7-specific antibodies mediate heterotypic immunity to rotavirus in humans // *Science translational medicine*. 2017. V. 9. №. 395. C. eaam5434.
8. Nikitin N.A., Zenin V.A., Trifonova E.A., Ryabchevskaya E.M., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Assessment of structurally modified plant virus as a novel adjuvant in toxicity studies // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2018. V. 97. P. 127–133.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ДВУМ ПРОИЗВОДНЫМ МОРФИНА В ВИДЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ВАКЦИНЫ ОТ ОПИАТНОЙ ЗАВИСИМОСТИ

Берзина А.Г.¹, Агельдинов Р.А.², Нестеров М.С.², Климова Т.А.², Гамалея Н.Б.², Ульянова Л.И.²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П.Сербского» Минздрава России, Москва, Россия. 119034, Москва, Кропоткинский пер., д.23

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», Московская обл., Россия. 143442, Московская область, п. Светлые горы, стр. 1

Рассмотрены перспективы применения липосом в создании фармацевтической формы липосомального препарата антиидиотипических – Ат2 антител к двум производным морфина, приводящего при иммунизации животных к выработке Ат3 антител, способных предотвращать действие морфина в организме.

Ключевые слова: адъюванты, вакцины, иммуноглобулин, липосомы.

Введение. Одним из перспективных направлений в борьбе с распространением наркомании является разработка вакцин, способных предотвращать негативные эффекты действия психоактивных веществ, а именно передозировку, нейротоксичность и т.п. При разработке новых вакцинных препаратов актуальным является подбор эффективных адъювантов, обеспечивающих формирование выраженного и длительно сохраняющегося иммунитета.

Цель исследования – изучить возможность использования липосом в качестве адъюванта для вакцинного препарата Ат2, в частности оценить усиление и специфичность иммунного ответа при использовании липосом, различающихся по размерам, в сравнении с действием адъюванта Фрейнда.

При получении липосом на основе сфингомиелина и холестерина была использована методика дегидратации/регидратации [1], с включением в липосомы антигена - Ат2 (Ig G кролика) к двум производным морфина – 3-0- карбоксиметильному и 6- гемисукцинильному [2].

Иммуногенность полученных липосомальных препаратов Ат2 изучали на пяти группах крыс, иммунизированных Ат2 без адъюванта, липосомальными препаратами Ат2 с размером частиц 110, 240 и 385 нм и препаратом Ат2 с адъювантом Фрейнда. Общий гуморальный иммунный ответ у крыс определяли с помощью непрямого метода ИФА. Ат3 определяли используя в качестве антигена на твердой фазе фенилазопроизводное морфина, конъюгированное с лизоцимом (ФАМ лиз.).

Показано, что иммунизация крыс липосомальными препаратами Ат2 приводит к выработке Ат3, которые положительно реагировали с производным морфина – ФАМ, что свидетельствует об их Ат1 подобной специфичности и возможности нейтрализовать морфин [3]. Установлено, что без применения адъювантов у крыс образуется слабый иммунный ответ на Ат2 (титр – 1×10^2). Усиление иммунного ответа происходило только с применением адъюванта Фрейнда и липосом. Размер липосом влиял на титр образующихся антител. Так липосомы размером – 240 и 385 нм стимулировали образование антител (титры – 4×10^3). Наилучшие иммуногенные свойства, сопоставимые с действием адъюванта Фрейнда, проявляли липосомы с размером частиц 110 нм (титр – $3,2 \times 10^4$).

Таким образом, липосомальная форма Ат2 способствовала выработке Ат3 иммунного ответа у крыс. Адъювантные свойства липосом размером 110 нм аналогичны действию адъюванта Фрейнда, что дает основание к их возможному применению при разработке вакцинных препаратов от опиатной зависимости.

Иммуноген для лечения и профилактики зависимости от опиатов //Патент России. – №2548802.2013.

Литература

1. Семакова А.П., Микшис Н.И.. Адъювантные технологии в создании современных вакцин //Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 2. – С. 28-35.
2. Трофимов А.В., Рак А.Я., Берзина А.Г., Ульянова Л.И., Гамалея Н.Б., Климова Т.А., Станкова Н.В.. Антиидиотипические моноклональные антитела к морфину: получение, свойства и перспективы использования // Биомедицина. – 2019. – Т. 15. – №2. – С. 63-68.
3. Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Шестаков К.А., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Фокин Ю.В.

PROSPECTS OF USING ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES TO TWO MORPHINE DERIVATIVES IN THE FORM OF LIPOSOMAL FORM FOR THE DEVELOPMENT OF A VACCINE AGAINST OPIATE ADDICTION

Berzina A.G.¹, Ageldinov R.A.², Nesterov M.S.², Klimova T.A.², Gamaleya N.B.², Ulyanova L.I.²

¹ Federal state budgetary institution "national medical research center of psychiatry and narcology named after V. p. Serbsky" of the Ministry of health of the Russian Federation, Moscow, Russia. 23 Kropotkinskiy pereulok, Moscow, 119034

² Federal state budgetary institution of science "Scientific center for biomedical technologies of the Federal medicobiological Agency", Moscow region, Russia. 143442, Moscow region, Svitlye Gory settlement, p. 1

The prospects of using liposomes in the creation of a pharmaceutical form of liposomal preparation of antiidiotypic Ab2 antibodies to two derivatives of morphine, which leads to the production of Ab3 antibodies capable of preventing the action of morphine in the body, are considered.

Key words: adjuvants, vaccines, immunoglobulin, liposomes.

Introduction. One of the promising areas in the fight against the spread of drug addiction is the development of vaccines that can prevent the negative effects of psychoactive substances, namely, overdose, neurotoxicity, etc. When developing new vaccine preparations, it is important to select effective adjuvants that ensure the formation of a pronounced and long-lasting immunity.

The aim of the study was to study the possibility of using liposomes as an adjuvant for Ab2 vaccine preparation, in particular, to assess the strengthening and specificity of the immune response when using liposomes that differ in size, in comparison with the action of Freund's adjuvant.

When preparing liposomes based on sphingomyelin and cholesterol, the technique of dehydration/rehydration was used [1], with the inclusion of Ab2 antigen (rabbit Ig G) to two morphine derivatives-3-0-carboxymethyl and 6-hemisuccinyl [2].

The immunogenicity of the obtained liposomal Ab2 preparations was studied in five groups of rats immunized with Ab2 without adjuvant, liposomal Ab2 preparations with particle sizes of 110, 240 and 385 nm, and Ab2 preparation with Freund's adjuvant. The overall humoral immune response in rats was determined using an indirect ELISA method. Ab3 were determined using as antigen on the solid phase phenylisopropylamine of morphine conjugated to lysozyme (PHAM Lis.).

It was shown that immunizing rats with liposomal Ab2 preparations leads to the production of Ab3, which reacted positively with morphine derivatives – PHAM, which indicates their Ab1-like specificity and the ability to neutralize morphine [3]. It was found that without the use of adjuvants, a weak immune response to Ab2 is formed in rats (titer – 1×10^{-2}). Increased immune response occurred only with the use of Freund's adjuvant and liposomes. The size of the liposomes affected the titer of the formed antibodies. Thus, liposomes measuring 240 and 385 nm stimulated the formation of antibodies (titers – 4×10^{-3}). The best immunogenic properties, comparable to the action of Freund's adjuvant, were shown by liposomes with a particle size of 110nm (titer – $3,2 \times 10^{-4}$).

Thus the liposomal form of Ab2 contributed to the development of Ab3 immune response in rats. Adjuvant properties of liposomes with a size of 110 nm are similar to the action of Freund's adjuvant, which gives grounds for their possible use in the development of opiate dependence vaccines.

References

1. Semakova A. P., Mikshis N. I. Adjuvant technologies in the creation of modern vaccines //Problems of particularly dangerous infections. 2016. No. 2. Pp. 28-35.
2. Trofimov And.In., Cancer A.I., Berzina A.G., Ulyanova L., And Others.And., Gamaleya N.(In Russian)ББ., Klimova T.And., Stankova N..In.. Antiidiotypic monoclonal antibodies to morphine: preparation, properties and prospects of use //Biomedicine. 2019. Vol. 15, No. 2. Pp. 63-68.
3. Gamaleya N. B., Berzina A. G., Shestakov K. A., Kapanadze G. D., Revyakin A. O., Fokin Yu. V. Immunogen for the treatment and prevention of opiate dependence //patent of Russia. – №2548802.2013.

УДК: 578.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-200-202

РАЗРАБОТКА СТАБИЛЬНОГО АНТИГЕНА СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ДЛЯ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ

**Д. Л. Грановский, Е. М. Рябчевская, Е. А. Евтушенко, Н. А. Никитин, О. А. Кондакова, П. А. Иванов,
 О. В. Карпова**

Кафедра вирусологии, Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия. 119234, Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12
 e-mail: dgran98@gmail.com

Получен стабильный генно-модифицированный рекомбинантный антиген сибирской язвы, состоящий из третьего и четвертого доменов протективного антигена *Bacillus anthracis*. Данный антиген в комплексе со структурно модифицированными частицами вирусов растений является перспективной основой для создания современной вакцины против сибирской язвы.

Ключевые слова: сибирская язва, протективный антиген, вакцины, вирусы растений, адъюванты.

Сибирская язва – опасное зоонозное заболевание, возбудителем которого является бактерия *Bacillus anthracis*. Разработка вакцины нового поколения против сибирской язвы – актуальная задача, поскольку лицензированные в настоящее время вакцины характеризуются существенными недостатками. К подобным недостаткам можно отнести свойственные для препаратов, полученных из бесклеточных фильтратов культуры *Bacillus anthracis*, высокую реактогенность и гетерогенность по составу, а также возможность реверсии к патогенной форме препарата в случае использования в качестве основы для вакцины аттенуированного штамма *Bacillus anthracis*.

Протективный антиген *Bacillus anthracis* (РА) - компонент токсина сибирской язвы. РА является наиболее перспективной основой для создания современной вакцины, поскольку он безопасен для человека, а большинство токсин-нейтрализующих антител против сибирской язвы вырабатывается именно к эпитопам, входящим в состав РА (McComb, Martchenko, 2016). В настоящее время активно ведутся разработки новых вакцин против сибирской язвы на основе полноразмерного рекомбинантного РА (гРА). Основные проблемы, которые необходимо решить при создании подобных вакцин – нестабильность и низкая иммуногенность гРА (Kondakova et al., 2019). Более того, было показано, что при адсорбции на гидроксиде алюминия, который часто используют в качестве адъюванта, гРА подвергается протеолизу и теряет способность индуцировать образование токсин-нейтрализующих антител (D'Souza et al., 2013). Таким образом, основная задача при разработке современной вакцины против сибирской язвы – стабилизация гРА, а также поиск адъюванта, в композиции с которым гРА будет оставаться стабильным и эффективно стимулировать выработку антител.

В рамках данного исследования нами были предложены два подхода к стабилизации полноразмерного гРА: модификация гРА, предотвращающая его деградацию, и адсорбция гРА на поверхности структурно модифицированного вируса табачной мозаики – сферических частиц (СЧ), обладающих высокими иммуностимулирующими свойствами. (Trifonova et al., 2017; Nikitin et al., 2018).

Экспериментальной моделью для отработки предложенных подходов стал экспрессированный в бактериальной системе рекомбинантный белок гРА3+4, содержащий 3-й и 4-й домены РА с увеличивающими стабильность белка заменами Asn713 и Asn719, подверженных спонтанному дезаминированию, на остатке глутамина (Verma, Burns, 2018). Выбор доменов обусловлен содержанием в них как минимум семи протективных эпитопов, антитела к которым эффективно нейтрализуют токсин сибирской язвы (Crowe et al., 2010; McComb, Martchenko, 2016). Для гРА3+4 нами продемонстрировано эффективное взаимодействие с антителами к полноразмерному немодифицированному гРА, а также показана высокая стабильность: гРА3+4 стабилен не менее 21 дня при +37°C и не менее 160 дней при +25°C. Показано эффективное образование комплексов гРА3+4 с СЧ, в составе которых гРА3+4 сохранял свою антигенную специфичность. Учитывая продемонстрированные ранее высокие иммуностимулирующие свойства СЧ, можно предположить, что белок гРА3+4 в комплексе с СЧ будет эффективно стимулировать иммунный ответ.

Несмотря на то, что в случае модели гРА3+4 использования одного подхода – замены подверженных дезаминированию аминокислотных остатков – оказалось достаточно для его эффективной стабилизации, по нашим предварительным данным, адсорбция на поверхности СЧ может оказаться актуальна при дальнейшей разработке и стабилизации модифицированного полноразмерного гРА. В свою очередь, сохранение антигенной специфичности гРА3+4 при адсорбции на поверхности СЧ позволяет надеяться на

аналогичный результат в отношении rPA. Таким образом, два предложенных в настоящей работе подхода к стабилизации протективного антигена сибирской язвы могут лечь в основу дальнейших исследований по созданию стабильного полноразмерного модифицированного rPA для разработки нового поколения вакцины против сибирской язвы.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (грант № 18–14-00044).

Литература

1. Crowe S. R., Ash L. L., Engler R. J. M., Ballard J. D., Harley J. B., Farris A. D., James J. A. Select human anthrax protective antigen epitope-specific antibodies provide protection from lethal toxin challenge // *J Infect Dis*. 2010. Vol. 202. P. 251–260.
2. D'Souza A. J., Mar K. D., Huang J., Majumdar S., Ford B. M., Dyas B., Ulrich R. G., Sullivan V. J. Rapid deamidation of recombinant protective antigen when adsorbed on aluminum hydroxide gel correlates with reduced potency of vaccine // *J Pharm Sci*. 2013. Vol. 102. №. 2. P. 454–461.
4. Kondakova O. A., Nikitin N. A., Evtushenko E. A., Ryabchevskaya E. M., Atabekov J. G., Karpova O. V. Vaccines against anthrax based on recombinant protective antigen: problems and solutions // *Expert Rev Vaccines*. 2019. Vol. 18. №. 8. P. 813–828.
5. McComb R. C., Martchenko M. Neutralizing antibody and functional mapping of *Bacillus anthracis* protective antigen - The first step toward a rationally designed anthrax vaccine // *Vaccine*. 2016. Vol. 34. №. 1. P. 13–19.
6. Nikitin N. A., Zenin V. A., Trifonova E. A., Ryabchevskaya E. M., Kondakova O. A., Fedorov A. N., Atabekov J. G., Karpova O., V. Assessment of structurally modified plant virus as a novel adjuvant in toxicity studies // *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018. Vol. 97. P. 127–33.
7. Trifonova E. A., Zenin V. A., Nikitin N. A., Yurkova M. S., Ryabchevskaya E. M., Putlyaev E. V., Donchenko E. K., Kondakova O. A., Fedorov A. N., Atabekov J. G., Karpova O. V. Study of rubella candidate vaccine based on a structurally modified plant virus // *Antivir Res*. 2017. Vol. 144. P. 27–33.
8. Verma A., Burns D. L. Improving the stability of recombinant anthrax protective antigen vaccine // *Vaccine*. 2018. Vol. 36. №. 43. P. 6379–6382.

UDC: 578.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-200-202

DEVELOPMENT OF STABLE ANTHRAX ANTIGEN FOR PLANT VIRUS-BASED VACCINE

D. L. Granovskiy, E. M. Ryabchevskaya, E. A. Evtushenko, N. A. Nikitin, O. A. Kondakova, P. A. Ivanov, O. V. Karpova

The Department of Virology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, 119234, 1-12 Leninskie Gory.

e-mail: dgran98@gmail.com

A stable genetically modified recombinant anthrax antigen containing 3rd and 4th *Bacillus anthracis* protective antigen domains has been obtained. Complexes of this antigen with structurally modified plant virus particles are a perspective basis for a new generation anthrax vaccine development.

Key words: anthrax, protective antigen, vaccines, plant viruses, adjuvants.

Anthrax is a dangerous zoonotic disease caused by a bacterium *Bacillus anthracis*. Currently licensed anthrax vaccines are associated with several significant disadvantages. In particular, acellular filtrates-based vaccines are characterized by high level of reactogenicity and heterogenous composition. At the same time, there is a risk of reversion to a pathogenic form in case of attenuated *Bacillus anthracis* strains application. Thus, the development of new generation anthrax vaccine is an actual problem.

Anthrax protective antigen (PA) is an anthrax toxin component. PA is the most perspective vaccine basis due to its safety and the fact that most of anthrax toxin-neutralizing antibodies are being raised against PA epitopes (McComb, Martchenko, 2016). Nowadays there is a wide field of research in the area of full-size recombinant PA (rPA)-based vaccines development. Crucial issues to be solved are instability and low immunogenicity of rPA (Kondakova et al., 2019). Moreover, it was shown that being adsorbed on aluminum hydroxide which is a common adjuvant rPA is subject to hydrolysis and loss of toxin-neutralizing antibodies production inducing properties (D'Souza et al., 2013). Therefore, the main challenges are rPA stabilization and the searching for an adjuvant being adsorbed on which rPA will remain stable and induce toxin-neutralizing antibodies production.

In this study two approaches of full-size rPA stabilization were proposed. The first approach is stability-increasing site-specific mutagenesis. The second one is rPA adsorption on the surface of previously developed in

our laboratory structurally modified tobacco mosaic virus – spherical particles (SPs). SPs are shown to have high immunopotentiating properties (Trifonova et al., 2017; Nikitin et al., 2018).

As an experimental model for proposed approaches study we have developed an expressed in bacterial system recombinant protein rPA3+4 containing 3rd and 4th PA domains with substitution of susceptible to deamidation Asn713 and Asn719 with glutamine (Verma, Burns, 2018). Chosen PA domains are known to contain at least 7 protective epitopes. Antibodies raised against this epitopes neutralize anthrax toxin effectively (Crowe et al., 2010; McComb, Martchenko, 2016). We have shown anti-rPA antibodies proper binding to rPA3+4. rPA3+4 is stable for at least 21 days under +37°C and for at least 160 days under +25°C. We have demonstrated that rPA3+4 is able to form complexes with SPs while maintaining antigenic specificity. Considering demonstrated previously high immunostimulating properties of SPs we can propose that rPA-SPs complexes will be able to effectively induce immune response.

Despite the fact that in case of rPA3+4 asparagine residues substitution was enough to increase the stability of the protein, in our preliminary view, rPA adsorption on SPs surface can be viable for a full-size rPA development and stabilization. At the same time, the maintenance of rPA3+4 antigenic specificity within SP-rPA3+4 complexes should offer hope for similar results for rPA. Therefore, both suggested approaches for rPA stabilization are able to become a foundation for further development of modified full-size rPA as a component of a new generation anthrax vaccine.

This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant number 18-14-00044).

References

1. Crowe S. R., Ash L. L., Engler R. J. M., Ballard J. D., Harley J. B., Farris A. D., James J. A. Select human anthrax protective antigen epitope-specific antibodies provide protection from lethal toxin challenge // *J Infect Dis*. 2010. Vol. 202. P. 251–260.
2. D'Souza A. J., Mar K. D., Huang J., Majumdar S., Ford B. M., Dyas B., Ulrich R. G., Sullivan V. J. Rapid deamidation of recombinant protective antigen when adsorbed on aluminum hydroxide gel correlates with reduced potency of vaccine // *J Pharm Sci*. 2013. Vol. 102. №. 2. P. 454–461.
4. Kondakova O. A., Nikitin N. A., Evtushenko E. A., Ryabchevskaya E. M., Atabekov J. G., Karpova O. V. Vaccines against anthrax based on recombinant protective antigen: problems and solutions // *Expert Rev Vaccines*. 2019. Vol. 18. №. 8. P. 813–828.
5. McComb R. C., Martchenko M. Neutralizing antibody and functional mapping of *Bacillus anthracis* protective antigen - The first step toward a rationally designed anthrax vaccine // *Vaccine*. 2016. Vol. 34. №. 1. P. 13–19.
6. Nikitin N. A., Zenin V. A., Trifonova E. A., Ryabchevskaya E. M., Kondakova O. A., Fedorov A. N., Atabekov J. G., Karpova O. V. Assessment of structurally modified plant virus as a novel adjuvant in toxicity studies // *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018. Vol. 97. P. 127–33.
7. Trifonova E. A., Zenin V. A., Nikitin N. A., Yurkova M. S., Ryabchevskaya E. M., Putlyaev E. V., Donchenko E. K., Kondakova O. A., Fedorov A. N., Atabekov J. G., Karpova O. V. Study of rubella candidate vaccine based on a structurally modified plant virus // *Antivir Res*. 2017. Vol. 144. P. 27–33.
8. Verma A., Burns D. L. Improving the stability of recombinant anthrax protective antigen vaccine // *Vaccine*. 2018. Vol. 36. №. 43. P. 6379–6382.

УДК 57.085.23 ББК30.16 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-202-205

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК 4647 И ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ НА ПРИБОРЕ ICELLIS NANO

Думченко Н.Б.

Федеральное бюджетное учреждение науки государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора

630559, Кольцово, Новосибирская область, Россия

e-mail: dumchenko@vector.nsc.ru

Отработана методика культивирования клеток 4647 и вируса осповакцины на приборе iCELLis Nano с неподвижным слоем зафиксированных микроносителей.

Ключевые слова: культура клеток, вакцина, микроносители.

Чтобы повысить эффективность и добиться более высокой рентабельности производства вакцины, необходимо использовать современные высокоэффективные технологии, с помощью которых процесс производства стал бы более надежным и рентабельным. Одним из них является метод культивирования адгезивных клеток в биореакторах с использованием микроносителей (МН). В последние годы разрабатываются и

тестируются новые МН, совершенствуются биореакторы. Биореактор iCELLis Nano с неподвижным слоем зафиксированных микроносителей из гидрофильного полиэтилена терефталата является именно такой инновационной системой, предназначенной для изготовления вирусных вакцин.

Цель – отработка методов культивирования культур клеток, вирусов и создания противовирусных вакцин на высокотехнологичном биореакторе iCELLis Nano.

Для культивирования клеток и вирусов использовали одноразовый биореактор iCELLis nano, предварительно заполненный микроносителями (полосками) из гидрофильного полиэтилена терефталата, неподвижно закрепленными по направлению вверх, объемом до 1000 мл. В работе использовали перевиваемую культуру клеток 4647 из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. В культуральный сосуд биореактора вносили 600 мл питательной среды Игла MEM (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) с 10 % сыворотки крови плодов коровы (Gibco, США), через 2 час добавляли 80×10^6 клеток в 200 мл питательной среды Игла MEM с 10 % сыворотки, культивировали клетки при температуре 37 °С. Через 24 час проводили подсчет количества выросших клеток, для этого из биореактора извлекали несколько полосок, с помощью светового микроскопа оценивали полноту заполнения полосок клетками. Микрофотосъемку проводили через 24 час роста культуры, используя цифровую фотокамеру и инвертированный микроскоп. Далее полоску помещали в раствор диспергента, в котором клетки отслаивались от МН, проводили подсчет клеток в камере Горяева.

Через 48 час питательную среду через систему перфузии обновляли свежей питательной средой в объеме до 600 мл и вносили 30 мл вируса осповакцины, штамм VACΔ6, проводили адсорбцию вируса в течение 2 час, затем добавляли 300 мл среды. Пробы брали через 24, 48, 72 час для определения специфической активности вируса осповакцины.

В процессе культивирования клетки оседали на поверхности микроносителей и начинали размножаться, заполняя пространство полосок (рис.). Количество клеток на полоске составляло до 200 000.

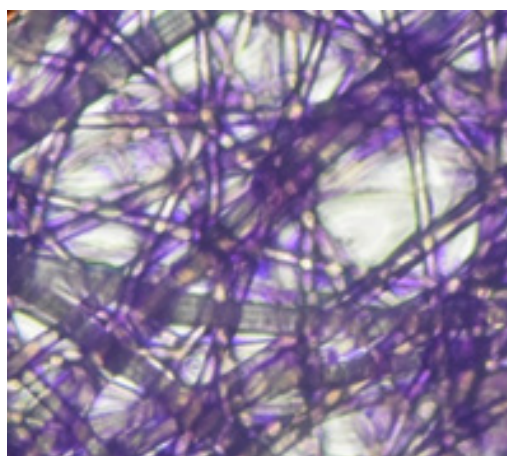


Рис.1

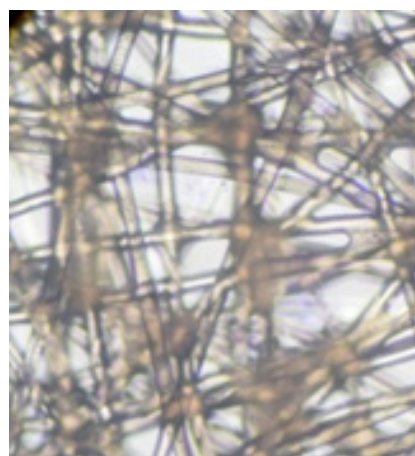


Рис. 2

Культура клеток 4647, 1 сутки, увел. 40

Рис.1 Клетки окрашены раствором кристаллического фиолетового.

Рис.2 Клетки без окрашивания.

Специфическую активность вируса осповакцины определяли методом бляшек на 95-100 % монослое культуры клеток 4647 в 6-ти луночном культуральном планшете после окрашивания монослоя клеток раствором кристаллического фиолетового в растворе спирта с формальдегидом. В результате проведенных исследований было установлено, что титр штамма VACΔ6 вируса осповакцины составил на 1-е сутки после заражения клеток $1,1 \times 10^4$ БОЕ/мл, на 2-е сутки $1,2 \times 10^5$ БОЕ/мл, на 3-е сутки $1,1 \times 10^5$ БОЕ/мл.

Таким образом, апробированный биореактор iCELLis nano может быть использован для отработки технологий культивирования перевиваемых культур клеток, вирусов и создания противовирусных вакцин.

Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания ГЗ-10/19 «Разработка технологии высокоэффективного производства противооспенной вакцины VACΔ6 на микроносителях в биореакторах».

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-202-205

CULTIVATION OF CELLS 4647 AND THE PERSPECTIVE VIRUS IN THE ICELLIS NANO BIOREACTOR

Dumchenko N.B.

Federal Budgetary Research Institution "State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector" of the Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protection and Human Well-being, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

A technique was developed for culturing 4647 cells and smallpox vaccine on the iCELLis Nano bioreactor with a fixed layer of fixed microcarriers.

Key words: cell culture, vaccine, bioreactor, microcarriers.

When developing the technology of anti-inflammatory vaccine, traditional methods of culturing cells in culture bottles and roller bottles are used, which does not fully meet the modern requirements for the production of cell cultures, viruses and vaccines. To increase efficiency and achieve higher cost-effectiveness of vaccine production, it is necessary to use modern high-performance technologies with which the production process would become more reliable and cost-effective. One of them is the method of culturing adhesive cells in bioreactors using microcarriers (MN). In recent years, new MNs have been developed and tested, bioreactors are being improved. The iCELLis Nano bioreactor with a fixed bed of fixed microcarriers made of hydrophilic polyethylene terephthalate is just such an innovative system designed for the manufacture of viral vaccines.

The goal - the development of methods for culturing cell cultures, viruses and the creation of antiviral vaccines on the high-tech iCELLis Nano bioreactor

For the cultivation of cells and viruses, the iCELLis nano disposable bioreactor was used, pre-filled with microcarriers (strips) of hydrophilic polyethylene terephthalate, motionlessly fixed upward, with a volume of up to 1000 ml. In the work we used a transplantable culture of cells 4647 from the collection of the Federal State Institution of Scientific Research of the World Bank "Vector" of Rospotrebnadzor.

600 ml of nutrient medium Eagle MEM was introduced into the culture vessel of the bioreactor (FBUN SSC VB "Vector" Rospotrebnadzor) with 10% blood serum of cow fruits (Gibco, USA), after 2 hours 80×10^6 cells in 200 ml of nutrient medium Needle MEM with 10 were added % serum, cells were cultured at a temperature of 37°C . After 24 hours, the number of grown cells was counted; for this, several strips were removed from the bioreactor, and the completeness of filling the strips with cells was evaluated using a light microscope. Microphotography was performed after 24 hours of culture growth using a digital camera and an inverted microscope. Next, the strip was placed in a dispersant solution, in which the cells exfoliated from the MN, the cells were counted in the Goryaev chamber.

After 48 hours, the nutrient medium through the perfusion system was updated with fresh nutrient medium in a volume of up to 600 ml and 30 ml of vaccinia virus, strain VACΔ6 were added, the virus was adsorbed for 2 hours, then 300 ml of medium was added. Samples were taken after 24, 48, 72 hours to determine the specific activity of the vaccinia virus.

During cultivation, cells settled on the surface of microcarriers and began to multiply, filling the space of the strips (Fig.). The number of cells on the strip was up to 200,000.

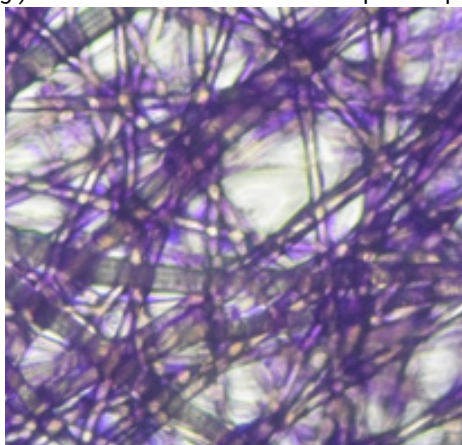


Fig. 1

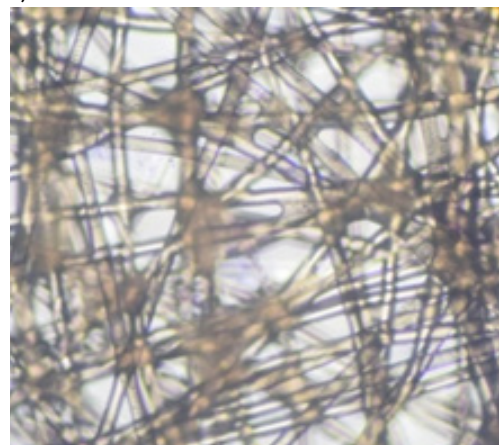


Fig. 2

Cell culture 4647, 1 day, stole. 40

Fig. 1 Cells are stained with a crystal violet solution.

Fig. 2 Cells without staining.

The specific activity of the vaccinia virus was determined by plaque on a 95-100% monolayer of cell culture 4647 in a 6-well culture plate after staining the cell monolayer with a solution of crystalline violet in a solution of alcohol with formaldehyde. As a result of the studies, it was found that the titer of the VACΔ6 strain of smallpox vaccine virus amounted to 1.1×10^4 PFU / ml on the 1st day after infection of the cells, 1.2×10^5 PFU / ml on the 2nd day, 1.1×10^5 PFU / ml on the 3rd day

Thus, the proven iCELLis nano bioreactor can be used to develop technologies for cultivating transplantable cell cultures, viruses, and creating antiviral vaccines.

The study was carried out as part of the implementation of state assignment GZ-10/19 "Development of a technology for the highly efficient production of anti-arthritis vaccine VACΔ6 on microcarriers in bioreactors".

УДК 602.64 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-205-206

СОЕДИНЕНИЯ, ОБЛАДАЮЩИЕ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ EX VIVO, КАК ВОЗМОЖНЫЕ АДЪЮВАНТЫ ДЛЯ ГЕНОИНЖЕНЕРНЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН

Масалова О.В., Леснова Е.И., Пермьякова К.Ю., Пронин А.В.

ФГБУ "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России, Москва, Россия 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18. e-mail: ol.mas@mail.ru

В культуре лимфоцитов мыши ex vivo определена иммуностимулирующая активность ряда ранее не изученных соединений. Для 6 из 19 соединений показано увеличение функциональной активности Т-клеток. Данные соединения перспективны в качестве адъювантов для генноинженерных вакцин.

Ключевые слова: адъюванты, рекомбинантные белки, ДНК-конструкции, пролиферация лимфоцитов, интерферон-гамма.

Для многих заболеваний, вызываемых вирусами, например, вирусом гепатита С, вирусом иммунодефицита человека, вирусами геморрагических лихорадок, вакцины не разработаны. Причины – высокая изменчивость вирусов, а также отсутствие или ограниченная возможность использования клеточных систем для вирусной репликации и, как следствие, невозможность создать традиционные вакцинные препараты, содержащие инактивированные или аттенуированные штаммы вирусов. Для создания вакцин против подобных инфекций применяется другой подход: разрабатываются рекомбинантные вакцины на основе биотехнологических продуктов – рекомбинантных белков и ДНК-конструкций, содержащих фрагменты генома патогена, в разных векторных системах. Иммуногенность рекомбинантных вакцин слабая, поэтому они требуют применения адъювантов. Распространенные лицензированные адъюванты, например, алюминиевые квасцы, водно-масляные эмульсии индуцируют преимущественно гуморальный ответ [1, 2]. Однако при большинстве вирусных инфекций критичен не только гуморальный, но и эффективный клеточный иммунный ответ. Цель работы состояла в сравнительном анализе способности ряда соединений оказывать иммуностимулирующее действие на функциональную активность Т-клеток мышей.

Лимфоциты получали из селезенки мышей линии DBA/2J и культивировали в среде RPMI-1640, дополненную 20% эмбриональной телячьей сыворотки. В качестве классического стимулятора активности Т-клеток использовали конканавалин А (кoнА, 5 мкг/мл). Испытуемые соединения добавляли в концентрациях, подобранных в предварительных опытах, и культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 3 суток. Изменение функциональной активности Т-клеток в ответ на кoнА под влиянием соединений оценивали по стимуляции пролиферации в тесте включения [³H]-тимидина и по секреции ИФН-γ, определяя концентрацию цитокина в культуральных жидкостях.

Протестировано 19 соединений, влияющих на молекулярные пути и иммунный ответ. Большинство веществ снижало активность клеточного ответа на кoнА или не изменяло его. Блокировка активности аргиназы, продуцируемой миелоидными супрессорными клетками MDSC, ингибитором NOHA приводила к увеличению пролиферативной активности Т-клеток в ответ на кoнА на 30%. Сходное действие оказывало подавление функции Т-регуляторных клеток антителами к CD152. Стимуляция пролиферации лимфоцитов и/или секреции ИФН-γ установлены также при использовании препарата фоспренил на основе полипренилфосфатов и трех других биологически активных соединений: антиоксиданта N-acetyl cysteine, синтетического олигодезоксинуклеотида, несущего неметилированные CpG-мотивы, и ингибитора орнитиндекарбоксилазы,

катализирующего биосинтез полиаминов – дифторметилорнитина. Отобранные соединения представляют интерес как потенциальные адъюванты для кандидатных вакцин, повышающие Т-клеточный ответ на генно-инженерные конструкции, содержащие аминокислотные и/или нуклеотидные последовательности вирусов.

Литература

1. Del Giudice G., Rappuoli R., Didierlaurent A. *Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines* // *Semin Immunol.* 2018. Vol. 39. P. 14-21.
2. Burakova Y., Madera R., McVey S., Schlup J., Shi J. *Adjuvants for Animal Vaccines* // *Viral Immunol.* 2018. Vol. 31. № 1. P. 11-22.

UDK 602.64 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-205-206

COMPOUNDS HAVING THE IMMUNOSTIMULATING ACTIVITY EX VIVO, AS POSSIBLE ADJUVANTS FOR GENETICALLY ENGINEERED ANTIVIRAL VACCINES

Masalova O.V., Lesnova E.I., Permyakova K.Yu., Pronin A.V.

*Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation
 Russia, Moscow, 123098, Gamaleya str., 18. e-mail: ol.mas@mail.ru*

In the mouse lymphocyte culture ex vivo, the immunostimulating activity of a number of previously unexplored compounds was determined. Six of the 19 compounds showed an increase in the functional activity of T cells. These compounds are promising as adjuvants for genetically engineered vaccines.

Key words: adjuvants, recombinant proteins, DNA constructs, lymphocyte proliferation, gamma interferon.

For many diseases caused by viruses, for example, hepatitis C virus, human immunodeficiency virus, hemorrhagic fever viruses, vaccines have not been developed. The reasons are the high variability of viruses, as well as the absence or limited ability to use cell systems for viral replication and, as a result, the inability to create traditional vaccine preparations containing inactivated or attenuated strains of viruses. A different approach is used to create vaccines against such infections: recombinant vaccines are being developed based on biotechnological products – recombinant proteins and DNA constructs containing fragments of the pathogen genome in different vector systems. The immunogenicity of recombinant vaccines is weak, therefore, they require the use of adjuvants. Common licensed adjuvants, for example, aluminium alums, water-in-oil emulsions induce a predominantly humoral response [1, 2]. However, with most viral infections, not only the humoral, but also an effective cellular immune response is critical. The aim of the work was a comparative analysis of the ability of a number of compounds to have an immunostimulating effect on the functional activity of mouse T cells.

Lymphocytes were obtained from the spleens of DBA/2J mice and cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 20% fetal calf serum. Concanavalin A (conA, 5 µg / ml) was used as a classical stimulator of T-cell activity. The test compounds were added at concentrations selected in the preliminary experiments and cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ for 3 days. The change in the functional activity of T cells in response to conA under the influence of the compounds was evaluated by stimulation of proliferation in the test of [³H]-thymidine incorporation and by IFN-γ secretion, determining the concentration of cytokine in culture fluids.

Tested 19 biologically active compounds, affecting the molecular pathways and immune response. Most substances reduced the activity of the cellular response to conA or did not change it. Blocking the activity of arginase produced by myeloid suppressor cells MDSC, an NOHA inhibitor, increased the proliferative activity of T cells in response to conA by 30%. A similar effect was exerted by the suppression of the function of T-regulatory cells by antibodies to CD152. Stimulation of lymphocyte proliferation and/or IFN-γ secretion was also established using the phosprenyl preparation based on polyprenyl phosphates and three other biologically active compounds: the antioxidant N-acetyl cysteine, a synthetic oligodeoxynucleotide that carries unmethylated CpG motifs, and an ornithine decarboxylase inhibitor catalyzing the biosynthesis of polyamines - difluoromethylornithine. The selected compounds are of interest as potential adjuvants for candidate vaccines that increase the T-cell response to genetically engineered constructs containing amino acid and/or nucleotide sequences of viruses.

References

1. Del Giudice G., Rappuoli R., Didierlaurent A. *Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines* // *Semin Immunol.* 2018. Vol. 39. P. 14-21.
2. Burakova Y., Madera R., McVey S., Schlup J., Shi J. *Adjuvants for Animal Vaccines* // *Viral Immunol.* 2018. Vol. 31. № 1. P. 11-22.

ОЦЕНКА ИММУНОКОРРЕГИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА PHALLUS IMPUDICUS ПО ИЗМЕНЕНИЮ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНОВ ЖИВОТНЫХ

Разин А.Н., Волков М.Ю.

Научно-производственное объединение Биолюкс
192236, г. Санкт-Петербург, ул. Белы Куна, д.34, литер А
e-mail: pharmlines@yandex.ru

Произведена оценка иммунокорректирующего свойства препарата базидиального гриба *Phallus impudicus* с целью в дальнейшем использовать для посерийного контроля препарата в различных лекарственных формах по показателю "Биологическая активность" в условиях лабораторий контрольных служб.

Ключевые слова: *Phallus impudicus*, веселка, биологическая активность, гастропротектор, иммунокомпетентный.

Биопрепараты на основе базидиальных грибов широко исследуются в настоящее время. Препарат на основе *Phallus impudicus* получают методом глубинного культивирования мицелия с последующей сублимационной сушкой и измельчением. Фракционируют через сито диаметром 50 мкм. Данный препарат ранее исследовали на антиоксидантную, иммунологическую и противоканцерогенную активности [3, 4].

Для подтверждения иммунокорректирующего действия препарата *Phallus impudicus* (ВЕСЕЛКА) исследования проводили на 150 крысах-самцах, массой 120-180 г. В опыте использовали четыре группы животных: 1 - животные с интактной иммунной системой, 2 - животные с интактной иммунной системой, которым вводили водную суспензию препарата ВЕСЕЛКА, 3 - животные с иммунной депрессией, 4 - животные, которым на фоне иммунной депрессии, вводили водную суспензию препарата ВЕСЕЛКА. У крыс иммунодефицитное состояние, сопровождавшееся снижением массы тимуса и селезенки, вызывали введением 0.3 мл раствора гидрокортизона ацетата (ГКЗ) в концентрации 25 мг/мл внутрибрюшинно. Через 48 часов после введения ГКЗ, крыс делили на две равные группы, одной из которых в течение последующих трех дней вводили водную суспензию препарата ВЕСЕЛКА в объеме 0,2 мл.

О характере влияния препарата ВЕСЕЛКА на функциональное состояние иммунной системы судили по изменению иммунокомпетентных органов - относительной массы тимуса (ОМТ) и относительной массы селезенки (ОМС). Для дополнительной оценки биологического действия препарата, у этих животных исследовалось состояние слизистой оболочки желудка. С этой целью всем четырем группам крыс вводили внутрь по 1 мл абсолютного спирта, через 1 час животных декапитировали, извлекали тимус и селезенку и желудок. Определяли ОМТ и ОМС. Оценку состояния слизистой оболочки желудка проводили по патентованному методу "Владивостокского государственного медицинского университета" [2]. У контрольных и опытных животных измеряли длину участков поражений слизистой оболочки желудка в мм. После суммирования полученных значений вычисляли средний показатель поражения в мм для одного животного в каждой группе.

В результате анализа полученных данных оказалось, что под влиянием ГКЗ ОМТ снизилась в среднем на 11 %, а ОМС - на 20,5%. При введении крысам препарата ВЕСЕЛКИ независимо от способа его применения наблюдалось восстановление массы иммунокомпетентных органов. Относительная масса последних оказалась выше контрольных величин в среднем на 6-9%.

Экспериментальные данные, полученные с помощью достаточно простого и надежного морфометрического метода [1] оценки иммунокомпетентных органов у животных с иммунодепрессией свидетельствуют, что препарат ВЕСЕЛКА обладает иммуномодулирующим действием.

Анализ состояния слизистой оболочки желудка у этих животных показал, что средняя длина участков деструктивных поражений в контроле (группа 1) составила в среднем 4,13 мм, во 2-ой группе - 3,5 мм в 3-й группе - 28,3 мм, тогда как в 4-ой группе, длина участков деструктивных поражений составила всего лишь 9,1 мм.

Таким образом, показано, что на фоне иммунодефицитного состояния у животных более выражено защитное действие препарата на слизистую оболочку желудка. Наши данные подтверждает наличие гастропротекторного действия Веселки на интактных животных.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. // Руководство. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.: ил.
2. Патент RU 2469324
3. Разин А.Н. Технология получения биологически активной субстанции *Phallus impudicus* и её применение для конструирования биопрепаратов с противоопухолевыми и антиоксидантными свойствами // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Москва 2011
4. Разин А.Н., Волков М.Ю. Изучение противоопухолевых свойств высших базидиомицетов Шиитаке (*Lentinus edodes*), Трутовика листовничного (*Laricifomes officinalis*) и Веселка (*Phallus impudicus*) // Ветеринарная медицина. – 2009 г. – № 1-2. – С. 71-75.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-207-209

EVALUATION OF THE IMMUNOCORRECTIVE EFFECT OF VESELKA ON CHANGES IN IMMUNOCOMPETENT ORGANS OF ANIMALS

Razin A. N., Volkov M. Yu.

Biolux research and production Association
 192236, St. Petersburg, Bely Kuna str., 34, letter A
 e-mail: pharmlines@yandex.ru

The immunocorrective properties of the basidial fungus *Phallus impudicus* were evaluated in order to further use the drug in various dosage forms for batch control according to the indicator "Biological activity" in the conditions of control services laboratories.

Key words: *Phallus impudicus*, Veselka, biological activity, gastroprotector, immunocompetent.

Biopreparations based on basidial fungi are widely studied at the present time. Biological product on the basis of the *Phallus impudicus* is obtained by submerged cultivation of mycelium with subsequent freeze drying and grinding. Fractionated through a sieve with a diameter of 50 microns. This biopreparation was previously studied for antioxidant, immunological, and anti-carcinogenic activity [3, 4].

To confirm the immunocorrective effect of VESELKA, studies were performed on 150 male rats, weighing 120-180 g. The experiment used four groups of animals: 1 – animals with an intact immune system; 2 – animals with an intact immune system that were injected with an aqueous suspension of VESELKA; 3 – animals with immune depression; 4 – animals that were injected with an aqueous suspension of VESELKA against the background of immune depression. The experiment was reproduced 5 times. In three experiments, the suspension of the drug VESELKA was administered subcutaneously, in other two – it was administered orally.

In rats, the immunodeficiency state, accompanied by a decrease in the mass of the thymus and spleen, was induced by the introduction of 0.3 ml of a solution of hydrocortisone acetate (HCA) at a concentration of 25 mg/ml via intraperitoneal injection. 48 hours after the introduction of HCA, the rats were divided into two equal groups, one of which was subjected to the aqueous suspension of VESELKA in the amount of 0.2 ml for the next three days.

The nature of the effect of VESELKA on the functional state of the immune system was judged by changes in immunocompetent organs: the relative mass of the thymus (RMT) and the relative mass of the spleen (RMS). To further evaluate the biological effect of the drug, the state of the gastric mucosa was studied in these animals. For this purpose, all four groups of rats were injected with 1 ml of absolute alcohol; 1 hour after that, the animals were decapitated, and the thymus, spleen and stomach were removed. The RMT and RMS were determined. The state of the gastric mucosa was evaluated using the patented method of the Vladivostok state medical University [2]. In control groups and experimental groups of animals, the length of lesions of the gastric mucosa was measured in mm. After summing up the obtained values, the average lesion index in mm was calculated for one animal in each group.

The analysis of the data revealed that under the influence of HCA, OMT decreased on average by 11 %, and RMS - 20.5%. When the drug VESELKA was administered to rats, regardless of which way it was administered, the mass of immunocompetent organs was partially restored. The relative mass of the latter was higher than the control values by an average of 6-9%.

Experimental data was obtained using a fairly simple and reliable morphometric method [1] for evaluating immunocompetent organs in animals with immunosuppression, and indicate that VESELKA has an immunomodulatory effect.

Analysis of the state of the gastric mucosa in these animals showed that the average length of destructive

lesions in the control group (group 1) averaged 4.13 mm, in the 2nd group -3.5 mm in the 3rd group-28.3 mm, while in the 4th group, the length of destructive lesions was only 9.1 mm.

Thus, it is shown that the protective effect of the drug on the gastric mucosa is more pronounced against the background of immunodeficiency in animals. Our data confirms the presence of gastroprotective effect of VESELKA on the animals with intact immunity.

References

1. Avtandilov G. G. *Medical morphometry.// Guide.* - Moscow: Medicine, 1990. - 384 p.: Il.
2. Patent RU 2469324+
3. Razin A. N. *Technology for obtaining the biologically active substance Phallus impudicus and its application for the construction of biological products with antitumor and antioxidant properties / / abstract of the thesis for the degree of candidate of biological Sciences, Moscow 2011*
4. Razin A. N., Volkov M. Yu. *Study of antitumor properties of higher basidiomycetes Shiitake (Lentinus edodes), larch tinder (Laricifomes officinalis) and Veselka (Phallus impudicus) / / Veterinary medicine.* - 2009-No. 1-2. - Pp. 71-75

УДК 577.112, 577.181 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-209-210

НОВЫЕ β -ШПИЛЕЧНЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ИЗ МОРСКИХ ПОЛИХЕТ

Сафронова В.Н., Пантелеев П.В., Болосов И.А., Сычев С.В., Овчинникова Т.В.

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
Москва, Россия
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10
e-mail: saf-victorianik@yandex.ru

Получены рекомбинантные β -шпилечные BRICHOS-ассоциированные антимикробные пептиды из полихет *Capitella teleta* и *Arenicola marina* и проведено исследование их антибактериальной и гемолитической активности.

Ключевые слова: антимикробные пептиды; полихета; BRICHOS-домен; рекомбинантный пептид; β -шпилечная структура.

Антимикробные пептиды (АМП) являются важными компонентами системы врожденного иммунитета у животных и растений. Для беспозвоночных животных роль АМП особенно важна ввиду отсутствия у них адаптивного иммунитета. Полихеты представляют собой эволюционно древнюю группу беспозвоночных, преимущественно обитающих в морской среде. Однако, иммунные механизмы этого класса кольчатых червей все еще мало изучены. Ранее мы обнаружили, что BRICHOS-домен может быть универсальным про-доменом, который участвует в биосинтезе различных структурных типов АМП в полихетах по аналогии с кателин-подобным доменом (CLD) у позвоночных. В этом исследовании новые β -шпилечные BRICHOS-ассоциированные АМП из морских видов полихет были идентифицированы в базах данных нуклеотидных последовательностей, и экспрессия их генов была доказана на уровне транскриптома. Ряд рекомбинантных аналогов природных пептидов из морских полихет *Capitella teleta* и *Arenicola marina* был получен с использованием системы гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* BL21 (DE3). Было показано, что пептиды из *Capitella teleta* нетоксичны в отношении нормальных клеток млекопитающих в концентрации до 64 мкМ, в то время как пептиды из *Arenicola marina* проявляют выраженный гемолитический эффект. Все пептиды были активны в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая мультирезистентные штаммы. Также были исследованы предполагаемые механизмы антибактериального действия и антибиопленочной активности. Обнаруженные АМП можно рассматривать в качестве потенциальных прототипов новых терапевтических средств.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (проект РФФИ-БРИКС 18-54-80026).

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-209-210

NOVEL β -HAIRPIN ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM MARINE POLYCHAETA

V.N. Safronova, P.V. Panteleev, I.A. Bolosov, S.V. Sychev, T.V. Ovchinnikova

M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russia
 117997 Moscow Miklukho-Maklaya str. 16/10
 e-mail: saf-victorianik@yandex.ru

Recombinant β -hairpin BRICHOS-associated antimicrobial peptides from the polychaetes *Capitella teleta* and *Arenicola marina* were obtained, and their antibacterial and hemolytic activity was studied.

Key words: antimicrobial peptide; polychaeta; BRICHOS domain; recombinant peptide; β -hairpin structure.

Antimicrobial peptides (AMPs) are an important component of innate immunity of the system in animals and plants. Polychaetes is the class of annelid worms living mainly in the marine environment. Polychaetes are an evolutionary ancient group of invertebrates, however their immune mechanisms are still obscure. Earlier, we have found that the BRICHOS domain can be a universal prodomain that participates in the biosynthesis of various structural types of AMPs in polychaetes by analogy with the cathelin-like domain (CLD) in vertebrates. In this study, novel β -hairpin BRICHOS-associated AMPs from marine polychaeta species were identified in nucleotide sequence databases and proved at the transcriptome level. A panel of recombinant analogs of natural peptides from *Capitella teleta* and *Arenicola marina* were obtained with the use of *E. coli* BL21(DE3) expression system. The peptides from *Capitella teleta* were shown to be non-toxic against normal mammalian cells at concentration up to 64 μ M, while the peptide from *Arenicola marina* exhibited a pronounced hemolytic effect. All the peptides were active against Gram-positive and Gram-negative bacteria including multidrug-resistant strains. A putative mechanism of antibacterial action as well as an antibiofilm activity were also investigated. The discovered AMPs may be considered as candidate compounds for the development of new therapeutic agents.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR project No. 18-54-80026).

УДК: 615.371, ББК: 52.66 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-210-212

ИММУНОГЕННЫЕ И ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО КАСSETУ ГЕНОВ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА МАРБУРГ

А.В.Семенова, Г.Ф.Сиволобова, А.А.Гражданцева, С.А.Пьянков, О.С.Таранов, О.В.Пьянков, Г.В.Кочнева

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор", Россия, 630559, Кольцово,
 e-mail: tkacheva_av@mail.ru, +79628327542

На основе высокоаттенуированного штамма MVA вируса осповакцины сконструирован рекомбинантный вариант MVA-GP-VP40-MARV, экспрессирующий кассету генов GP и VP-40 вируса Марбург с образованием иммуногенных вирусоподобных частиц и обеспечивающий защиту морских свинок от летальной инфекции вирусом Марбург.

Ключевые слова: MVA, вирусоподобные частицы, вирус Марбург.

Создание эффективных вакцин против особо опасных филовиральных инфекций, к которым относится, в частности, геморрагическая лихорадка Марбург (Marburgvirus, MARV), является актуальной задачей. Перспективную вакцинную платформу представляет комбинация двух подходов – использование безопасного вирусного вектора и непатогенных вирусоподобных частиц (ВПЧ), имитирующих природную вирусную инфекцию.

Штамм MVA вируса осповакцины (VACV) является признанной во всём мире безопасной противосспенной вакциной и может использоваться в качестве высокоперспективного вируса-вектора для создания вакцин [1].

В качестве трансгенов для продукции ВПЧ MARV необходимо использовать кассету из нескольких генов структурных белков MARV, один из которых обладает способностью к самосборке (например, матриксный вирионный белок VP40), а другой/другие являются поверхностными гликопротеинами (GP).

Для введения трансгенов в геном МВАнами была сконструирована инсерционная плаزمида pDel2-GPppopp-VPppopp-Pat, содержащая вставку кассеты генов VP40 и GP. Рекомбинантный штамм MVA-GP-VP40-MARV получали методом временной доминантной селекции с использованием в качестве доминантного селективного маркера гена устойчивости к пуromицину Pat.

Вестерн-блот анализ экспрессии трансгенов в составе MVA-GP-VP40-MARV показал, что GP и VP40 MARV выявляются как в лизатах, так и в культуральной среде инфицированных клеток. Электронно-микроскопический анализ среды клеток, инфицированных MVA-GP-VP40-MARV, выявил наличие большого количества ВПЧ с характерной формой и размерами вирионов MARV.

Для оценки иммуногенности и протективности проведена двукратная вакцинация морских свинок штаммом MVA-GP-VP40-MARV в дозе 108 БОЕ/животное внутримышечно с интервалом 4 недели. Показано, что при таком способе вакцинации через 4 недели после второй иммунизации происходит индукция формирования антител к вирусу осповакцины в титрах от 4 до 5 (титр антител представлен в виде значения log₁₀ разведение). В сыворотках крови опытной группы регистрируются также антитела к вирусу Марбург в титрах от 2 до 2,9.

Для оценки протективности MVA-GP-VP40-MARV обе группы морских свинок были инфицированы вирусом Марбург в дозе 50 ЛД₅₀. Инфицированных животных наблюдали в течение 21 дня (инкубационный период для лихорадки MARV). Все животные контрольной группы погибли на 11-14 день после инфекции, в то время как все животные опытной группы выжили без каких-либо признаков заболевания.

Таким образом, штамм MVA-GP-VP40-MARV является перспективным вакцинным штаммом, обеспечивающим 100%-ную защиту от летальной дозы MARV. MVA-GP-VP40-MARV кроме индукции иммунного ответа на встроенный трансген, формирует иммунитет и против ортопоксвирусов (к которым относится вирус оспы обезьян) [2]. Созданный рекомбинантный вариант VACV может рассматриваться как бивалентная вакцина против вирусов Марбург и оспы обезьян, что представляется целесообразным в связи с высоким пересечением ареалов распространения этих вирусов и опасностью двойного инфицирования.

Литература

1. Volz A., Sutter G. *Modified Vaccinia Virus Ankara* // *Advances in Virus Research*. 1st ed. Elsevier Inc., 2017. Vol. 97. P. 187–243.
2. Gilchuk I. et al. *Cross-Neutralizing and Protective Human Antibody Specificities to Poxvirus Infections* // *Cell*. 2016. Vol. 167, № 3. P. 684–694.e9.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-210-212

IMMUNOGENIC AND PROTECTIVE PROPERTIES OF RECOMBINANT VACCINIA VIRUS STRAIN, EXPRESSING GENE CASSETTE OF MARBURG VIRUS STRUCTURAL PROTEINS

A.Semenova, G.Sivolobova, A.Grazhdantseva, S.P'yankov, O.Taranov, O.P'yankov, G.Kochneva

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Russia, 630559, Koltsovo

Based on the highly attenuated vaccinia virus MVA strain, a recombinant variant MVA-GP-VP40-MARV was constructed, which expresses a cassette of the GP and VP-40 genes of the Marburg virus with the formation of immunogenic virus-like particles and protects Guinea pigs from a lethal infection by the Marburg virus.

Key words: MVA, vaccinia virus, Marburg virus, virus-like particles.

Development of effective vaccines against highly dangerous filovirus infections, which include, in particular, Marburg hemorrhagic fever (Marburg virus, MARV), is an urgent goal. A promising vaccine platform is a combination of two approaches - the use of a safe viral vector and non-pathogenic virus-like particles (VLP) that mimic a natural viral infection.

The MVA strain of vaccine virus (VACV) is a globally recognized safe smallpox vaccine and can be used as a highly promising vector virus for vaccines [1].

As a transgene for the production of VLP MARV, it is necessary to use a cassette of several genes of MARV structural proteins, one of which has the ability to self-assemble (for example, matrix virion protein VP40), and the other / others are surface glycoproteins (GP).

To introduce transgenes into the MVA genome, we constructed an integrative plasmid pDel2-GPppopp-VPppopp-Pat containing an insertion of the VP40 and GP gene cassette. The recombinant strain MVA-GP-VP40-MARV was obtained by the method of temporary dominant selection using the puromycin resistance gene Pat as a dominant selective marker.

Western blot analysis of transgene expression in the MVA-GP-VP40-MARV genome showed that GP and VP40 MARV are detected both in lysates and in the culture medium of infected cells. Electron microscopic analysis of the medium of cells infected with MVA-GP-VP40-MARV revealed the presence of a large number of VPL with the specific shape and size of MARV virions.

To evaluate the immunogenicity and protectiveness, double vaccination of guinea pigs with MVA-GP-VP40-MARV strain was performed at a dose of 108 PFU/animal intramuscularly with an interval of 4 weeks.

It was shown that with this method of vaccination in 4 weeks after the second immunization the formation of antibodies to vaccinia virus is induced in titers from 4 to 5 (antibody titer is presented as a log₁₀ dilution). Antibodies to Marburg virus in titers from 2 to 2.9 are also recorded in the serum of the experimental group.

To assess the protectiveness of MVA-GP-VP40-MARV, both groups of guinea pigs were infected with Marburg virus at a dose of 50 LD₅₀. Infected animals were observed for 21 days (incubation period for MARV fever). All animals of the control group died 11-14 days after infection, while all animals of the experimental group survived without any signs of disease.

Thus, the MVA-GP-VP40-MARV strain is a promising vaccine strain providing 100% protection against a lethal dose of MARV. MVA-GP-VP40-MARV, in addition to inducing an immune response to integrated transgenes, forms immunity against orthopoxviruses (which include monkeypox virus) [2]. The constructed recombinant variant of VACV can be considered as a bivalent vaccine against Marburg and monkeypox viruses that seems rational due to high crossing of the spreading areas of these viruses and the danger of double infection.

References

1. Volz A., Sutter G. *Modified Vaccinia Virus Ankara // Advances in Virus Research*. 1st ed. Elsevier Inc., 2017. Vol. 97. P. 187–243.
2. Gilchuk I. et al. *Cross-Neutralizing and Protective Human Antibody Specificities to Poxvirus Infections // Cell*. 2016. Vol. 167, № 3. P. 684–694.e9.

УДК 615.456 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-212-214

ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФТОРХИНОЛОНОВ НА ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

Скuredина А.А., Копнова Т.Ю., Якупова Л.Р., Ле-Дейген И.М., Кудряшова Е.В.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, кафедра химической энзимологии, Москва, Россия

119192, Москва, ул. Ленинские Горы, 1, стр 11Б

e-mail: skuredinanna@gmail.com

Исследовано влияние природы фторхинолонов ципрофлоксацина и левофлоксацина на их взаимодействие с человеческим сывороточным альбумином. Обнаружено, связывание фторхинолонов с белком приводит к тушению флуоресценции белка, а также обуславливает изменение кинетики высвобождения лекарства.

Ключевые слова: человеческий сывороточный альбумин, фторхинолоны, флуоресцентная спектроскопия

В современном мире инфекционные заболевания представляют собой серьезную угрозу для здоровья человека. Терапия инфекционных заболеваний включает в себя антибактериальные препараты, среди которых выделяются фторхинолоны (ФХ).

ФХ применяются для лечения широкого спектра бактериальных инфекций, вызванных грамотрицательными и грамположительными бактериями, в том числе *M. Tuberculosis*: кожных, офтальмологических, внутрибрюшных и внутрибольничных инфекций, а также для тяжелых заболеваний дыхательных путей, таких как туберкулез. ФХ могут быть введены в организм различными способами: перорально и парентерально [1]. Длительный курс терапии с применением высоких дозировок ФХ сопровождается развитием ряда побочных эффектов [2]. Использование систем доставки, носителей ФХ решить данные проблемы и увеличить эффективность терапии [3].

При разработке новых лекарственных форм ФХ необходимо учитывать взаимодействие активной молекулы с белками крови. В организме человека основным белком плазмы крови является человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), который выполняет ряд важных функций: регуляция проницаемости капиллярных мембран и коллоидного осмотического давления плазмы, связывание и транспортировка

различных метаболитов (холестерин, гормоны, жирные кислоты, лекарственные препараты и др.) [4]. Известно, что ФХ способны образовывать комплексы с ЧСА посредством гидрофобных и Ван-дер-ваальсовых взаимодействий, а также водородных связей [5].

В данной работе рассмотрено влияние физико-химических свойств ФХ: ципрофлоксацина (ЦФ) и левофлоксацина (ЛВ), - на механизм взаимодействия с ЧСА. Методом флуоресцентной спектроскопии установлено, что ФХ способствуют тушению спектра флуоресценции белка. ФХ способны взаимодействовать с человеческим сывороточным альбумином даже при низких мольных избытках (меньше 1), насыщение белка лекарством происходит при мольном избытке равном 5. В зависимости от физико-химических свойств фторхинолонов установлено два преобладающих взаимодействия с белком: для более гидрофобного ципрофлоксацина характерны преимущественные гидрофобные взаимодействия с триптофановыми остатками белка, а для менее гидрофобного левофлоксацина – электростатические на поверхности ЧСА. Наиболее сильные изменения в состоянии белка вносят гидрофобные взаимодействия, которые приводят к значительному изменению профиля высвобождения лекарства в условиях, приближенных к физиологическим (pH 7,4, 37°C): наблюдается замедление высвобождения ципрофлоксацина в 2,5 раза по сравнению со свободным ФХ. Полученные результаты позволяют предсказать фармакокинетические параметры лекарства в зависимости от его структуры и физико-химических свойств.

Литература

1. Appelbaum P.C., Hunter P.A. *The fluoroquinolone antibacterials: Past, present and future perspectives // Int. J. Antimicrob. Agents. 2000. Vol. 16, № 1. P. 5–15.*
2. Liu H.H. *Safety profile of the fluoroquinolones: Focus on levofloxacin // Drug Saf. 2010. Vol. 33, № 5. P. 353–369.*
3. Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Kudryashova E. V. *Drug delivery systems for fluoroquinolones: New prospects in tuberculosis treatment // Russ. J. Bioorganic Chem. 2017. Vol. 43, № 5. P. 487–501.*
4. Fanali G. et al. *Human serum albumin: From bench to bedside // Mol. Aspects Med. Elsevier Ltd, 2012. Vol. 33, № 3. P. 209–290.*
5. Zhang L.W., Wang K., Zhang X.X. *Study of the interactions between fluoroquinolones and human serum albumin by affinity capillary electrophoresis and fluorescence method // Anal. Chim. Acta. 2007. Vol. 603, № 1. P. 101–110.*

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-212-214

INFLUENCE OF PHYSICAL-CHEMICAL PROPERTIES OF FLUOROQUINOLONES ON THEIR INTERACTION WITH HUMAN SERUM ALBUMIN

Skuredina A.A., Kopnova T.Y., Yakupova L.R., Le-Deygen I.M., Kudryashova E.V.

Lomonosov Moscow state University, Department of chemical Enzymology, Moscow, Russia
119192, Moscow, Leninskie Gory str., 1, page 11 B
e-mail: skuredinanna@gmail.com

The influence of the fluoroquinolones's nature ciprofloxacin and levofloxacin on their interaction with human serum albumin was investigated. The binding of fluoroquinolones with protein leads to the quenching of protein fluorescence and changes in the kinetics of drug release.

Key words: human serum albumin, fluoroquinolones, fluorescence spectroscopy

Infectious diseases are still a serious threat to human health. Treatment of infectious diseases includes antibacterial drugs, among which fluoroquinolones (FQ) can be distinguished. FQs are used in the treatment of a wide range of bacterial infections caused by gram-negative and gram-positive bacteria, including *M. Tuberculosis*: skin, ophthalmic, intraperitoneal and hospital-acquired infections, as well as severe respiratory diseases such as tuberculosis. FQ can be injected into the body in various ways: orally and parenterally [1]. A long therapy course with high doses of FQ is accompanied by the number of side effects [2]. Using drug delivery systems, FQ carriers, these problems can be solved and the effectiveness of therapy increases [3].

Upon developing new drug forms of FQ, it is necessary to take into account the interaction of the active molecule with blood proteins. In the human body the main plasma protein is human serum albumin (HSA), which performs a number of important functions: regulating the permeability of capillary membranes and colloidal osmotic pressure of plasma, binding and transporting various metabolites (cholesterol, hormones, fatty acids, drugs, etc.) [4]. It is known that FQs are able to form complexes with HSA through hydrophobic and van der Waals interactions, as well as hydrogen bonds [5].

In this paper, we consider the influence of the physical-chemical properties of FQ: ciprofloxacin (CF) and levofloxacin (LV) on the mechanism of interaction with HSA. By fluorescence spectroscopy it is established that FQs contribute to the quenching of the fluorescence spectrum of the protein. FQs are able to interact with human serum albumin even at low molar surpluses (less than 1), protein saturation with the drug occurs at a molar excess of 5. Depending on the physical and chemical properties of FQs, two predominant interactions with protein were found: for the more hydrophobic ciprofloxacin - predominant hydrophobic interactions with tryptophan protein residues are characteristic, and for the less hydrophobic levofloxacin - electrostatic interactions on the surface of the HSA. The strongest changes in the state of the protein are made by hydrophobic interactions, which lead to a significant change in the drug release profile under conditions similar to physiological (pH 7.4, 37°C): a 2.5-fold slowdown in the release of ciprofloxacin compared to free FQ. The results obtained will help to predict the pharmacokinetic parameters of the drug depending on its structure and physical and chemical properties.

References

1. Appelbaum P.C., Hunter P.A. *The fluoroquinolone antibacterials: Past, present and future perspectives* // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2000. Vol. 16, № 1. P. 5–15.
2. Liu H.H. *Safety profile of the fluoroquinolones: Focus on levofloxacin* // *Drug Saf.* 2010. Vol. 33, № 5. P. 353–369.
3. Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Kudryashova E. V. *Drug delivery systems for fluoroquinolones: New prospects in tuberculosis treatment* // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2017. Vol. 43, № 5. P. 487–501.
4. Fanali G. et al. *Human serum albumin: From bench to bedside* // *Mol. Aspects Med.* Elsevier Ltd, 2012. Vol. 33, № 3. P. 209–290.
5. Zhang L.W., Wang K., Zhang X.X. *Study of the interactions between fluoroquinolones and human serum albumin by affinity capillary electrophoresis and fluorescence method* // *Anal. Chim. Acta.* 2007. Vol. 603, № 1. P. 101–110.

УДК 578.832 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-214-216

СПОСОБНОСТЬ НОВОГО ИММУНОСТИМУЛЯТОРА SAPOMAX СТИМУЛИРОВАТЬ СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ К ГЕННОИНЖЕНЕРНЫМ БЕЛКАМ ГЕПАТИТА

Богоявленский А.П., Турмагамбетова А.С., Алексюк М.С., Алексюк П.Г., Соколова Н.С., Зайцева И.А., Березин В.Э.

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»

г. Алматы, Казахстан

050010, ул. Богенбай батыра, 105

e-mail: aichyck@mail.ru

Показано, что адъювант Sapomax эффективно стимулирует формирование уровней различных классов иммуноглобулинов против генно-инженерных белков вирусов гепатита В и С. При этом отсутствие стимуляции уровня IgG3 свидетельствует об отсутствии аллергических проявлений разработанного иммуностимулятора.

Ключевые слова: адъювант, иммунный ответ, генно-инженерный белок, вирус гепатита

Вакцинология 21 века, обладая возможностями создания рекомбинантных белков или систем на основе обратной генетики, лимитируется фактором отсутствия эффективных адъювантов, стимулирующих различные звенья иммунного ответа и не обладающих побочными эффектами. Одним из направлений исследований в разработке подобных адъювантов является конструирование иммуностимулирующих матриц включающих тритерпеновые гликозиды, холестерин и фосфо- или гликолипиды [1]. В наших исследованиях разработан адъювант подобного типа Sapomax [2, 3], не вызывающий побочных эффектов подобно сапонинам *Quillaja Saponaria*.

Целью настоящих исследований являлось изучение возможности использования данного препарата для стимуляции иммунного ответа против генно-инженерных белков вируса гепатита В (HbS антиген) и вируса гепатита С (Е белок).

Белых беспородных мышей иммунизировали подкожно. Доза белков составляла 6 мкг/мышь. Доза нанокапсулированного адъюванта составляла 45 мкг/мышь. Доза адъюванта сравнения гидроокись алюминия составляла 500 мкг/мышь. Сыворотки собирали через 3 недели после иммунизации. Уровень антител к IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 определяли методом ИФА [4]. В качестве вторичных антител использовали конъюгаты козьих антисывороток с пероксидазой хрена. В качестве субстрата использовали тетраметилбензидин.

Показано, что разработанный нанокапсулированный адъювант Sapomax способен эффективно стимулировать гуморальный иммунный ответ против генно-инженерных белков вируса гепатита В и С.

При этом, иммуностимулирующая активность нанокапсулированного адъюванта Sapomax заметно превышала иммуностимулирующую активность коммерческого адъюванта гидроокись алюминия. Нанокапсулированный адъювант Sapomax эффективно стимулировал синтез IgG, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b. Кроме того, нанокапсулированный адъювант Sapomax не формировал аллергического фона иммунного ответа (IgG3), что выгодно его отличает от такого же типа препаратов зарубежного производства на основе Quil, VetSap и т.д.

Благодарности: Исследование выполнено за счет программно-целевого финансирования BR05236330 Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Литература

1. Bigaeva E., Doorn Ev., Liu H., Hak E. Meta-Analysis on Randomized Controlled Trials of Vaccines with QS-21 or ISCOMATRIX Adjuvant: Safety and Tolerability. *PLoS One*. 2016. V. 5. P. 11(5):e0154757. doi: 10.1371/journal.pone.0154757.
2. Berezin V.E., Bogoyavlenskiy A.P., Tolmacheva V.P., Makhmudova N.R., Khudyakova S.S. et al. Immunostimulating complexes incorporating *Eimeria tenella* antigens and plant saponins as effective delivery system for coccidia vaccine immunization. *J Parasitol*. 2008. V. 94. P. 381-385. doi: 10.1645/GE-1289.1.
3. Turmagambetova A.S., Alexyuk P.G., Bogoyavlenskiy A.P., Zaitseva I.A., Omirtaeva E.S. et al. Adjuvant activity of saponins from Kazakhstani plants on the immune responses to subunit influenza vaccine. *Arch Virol*. 2017. V. 162. P. 3817-3826. doi: 10.1007/s00705-017-3560-53.
4. Gordon D.L., Sajkov D., Honda-Okubo Y., Wilkse S.H., Abang M. et al. Human Phase 1 trial of low-dose inactivated seasonal influenza vaccine formulated with Advax™ delta inulin adjuvant. *Vaccine*. 2016. V. 19. P. 3780–3786. doi:10.1016/j.vaccine.2016.05.071.

UDC 578.832 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-214-216

ABILITY OF THE NEW IMMUNOSTIMULATOR SAPOMAX TO STIMULATE A SPECIFIC IMMUNE RESPONSE TO GENE-ENGINEERED PROTEINS OF HEPATITIS

Bogoyavlenskiy A.P., Turmagambetova A.S., Alexyuk M.S., Alexyuk P.G., Sokolova N.S., Zaitseva I.A., Berezin V.E.

Research and Production Center for Microbiology and Virology
Almaty, Kazakhstan
050010, 105, Bogenbai Batyr Street
e-mail: aichyck@mail.ru

It was shown that adjuvant Sapomax effectively stimulates the formation of levels of various classes of immunoglobulins against gene-engineered proteins of the viruses of hepatitis B and C. Moreover, the absence of stimulation of IgG3 levels indicates the absence of allergic manifestations of the developed immunostimulator.

Key words: adjuvant, immune response, gene-engineered protein, hepatitis virus

Vaccinology in the 21 century possessing the ability to create of recombinant proteins or systems based on reverse genetics is limited by the factor of the absence of effective adjuvants that stimulate various parts of the immune response and do not have side effects. One of the areas of research in the development of such adjuvants is the construction of immunostimulating matrices including triterpene glycosides, cholesterol and phospho- or glycolipids [1]. In our studies the adjuvant Sapomax of the similar type was developed [2, 3] which does not cause side effects like *Quillaja Saponaria* saponins.

The aim of the present research was to study the possibility of using designed preparation to stimulate the immune response against gene-engineered proteins of hepatitis B virus (HbS antigen) and hepatitis C virus (E protein).

Outbred white mice were immunized subcutaneously. The dose of viral proteins was 6 µg/mouse. The dose of nanocapsulated adjuvant was 45 µg/mouse. The dose of the comparison adjuvant aluminum hydroxide was 500 µg/mouse. Serum was collected 3 weeks after immunization. The level of specific antibodies to IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 were determined by ELISA [4]. Conjugates of goat antisera with horseradish peroxidase were used as secondary antibodies. Tetramethylbenzidine was used as a substrate.

It was shown that the developed nanocapsulated adjuvant Sapomax is able to effectively stimulate a humoral immune response against gene - engineered proteins of the hepatitis B virus and hepatitis C virus.

Moreover, the immunostimulating activity of the nanocapsulated adjuvant Sapomax was significantly higher than the immunostimulating activity of commercial adjuvant aluminum hydroxide. The nanocapsulated adjuvant Sapomax effectively stimulated the synthesis of IgG, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b. In addition, the nanocapsulated adjuvant Sapomax did not form an allergic background of the immune response (IgG3) which favorably distinguishes it from the same type of foreign preparations based on Quil, VetSap, etc.

Acknowledgement: This work was supported by program BR05236330 from the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

References

1. Bigaeva E., Doorn Ev., Liu H., Hak E. *Meta-Analysis on Randomized Controlled Trials of Vaccines with QS-21 or ISCOMATRIX Adjuvant: Safety and Tolerability.* *PLoS One.* 2016. V. 5. P. 11(5):e0154757. doi: 10.1371/journal.pone.0154757.
2. Berezin V.E., Bogoyavlenskiy A.P., Tolmacheva V.P., Makhmudova N.R., Khudyakova S.S. et al. *Immunostimulating complexes incorporating Eimeria tenella antigens and plant saponins as effective delivery system for coccidia vaccine immunization.* *J Parasitol.* 2008. V. 94. P. 381-385. doi: 10.1645/GE-1289.1.
3. Turmagambetova A.S., Alexyuk P.G., Bogoyavlenskiy A.P., Zaitseva I.A., Omirtaeva E.S. et al. *Adjuvant activity of saponins from Kazakhstani plants on the immune responses to subunit influenza vaccine.* *Arch Virol.* 2017. V. 162. P. 3817-3826. doi: 10.1007/s00705-017-3560-53.
4. Gordon D.L., Sajkov D., Honda-Okubo Y., Wilkse S.H., Abang M. et al. *Human Phase 1 trial of low-dose inactivated seasonal influenza vaccine formulated with Advax™ delta inulin adjuvant.* *Vaccine.* 2016. V. 19. P. 3780–3786. doi:10.1016/j.vaccine.2016.05.071.

УДК 578.832 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-216-218

СПОСОБНОСТЬ ФЕНОЛЬНЫХ КИСЛОТ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЗАЩИЩАТЬ ОРГАНИЗМ ОТ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Турмагамбетова А.С., Богоявленский А.П., Алексюк П.Г., Соколова Н.С., Зайцева И.А., Березин В.Э.

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»
 г. Алматы, Казахстан
 050010, ул. Богенбай батыра, 105
 e-mail: aichyck@mail.ru

Показано, что галловая кислота, эллаговая кислота и патулетин обладают выраженными профилактическими свойствами, нейтрализующими развитие экспериментальной гриппозной инфекции.

Ключевые слова: растение, фенольная кислота, гриппозная инфекция, противовирусное свойство

Шифтовые и дрейфовые изменения антигенной структуры штаммов вируса гриппа в разных регионах земного шара, появление вариантов вируса гриппа устойчивых к основным типам лекарственных средств, способных вызывать вспышки инфекции среди восприимчивых популяций подросткового и пожилого возраста приводят к увеличению спроса на поиск новых стратегий лечения гриппозной инфекции. В Казахстане на долю гриппа и других ОРВИ приходится до 60% всех инфекционных заболеваний [1]. Наряду с совершенствованием вакцинопрофилактики, исключительно перспективным следует признать путь неспецифической защиты восприимчивого населения от гриппа и других ОРВИ, экстренной профилактики, осуществляемой в период сезонного подъема заболеваемости. В этом направлении ведется интенсивный поиск биологически активных веществ растительного происхождения, обладающих противовирусными свойствами в отношении широкого круга возбудителей для лечения и профилактики гриппа и других ОРВИ [2-3].

Целью исследований являлось на модели экспериментальной гриппозной инфекции на животных исследовать способность галловой кислоты, эллаговой кислоты и патулетина защищать организм от инфицирования.

Профилактическое действие препаратов в дозе 10 мг/кг в отношении эпидемически значимого штамма вируса гриппа А/Алматы/8/98 (H3N2) исследовали на модели белых беспородных мышей.

Профилактическое действие растительных очищенных соединений оценивали по количественному определению гена матриксного белка вируса гриппа в легких мышей через 7 дней после моделирования острой гриппозной инфекции с предварительным введением исследуемых соединений. Количественную оценку гена матриксного белка в образцах осуществляли с помощью TaqMan пробы в ПЦР в реальном времени.

Наиболее выраженное профилактическое действие проявлял патулетин (98%). Эллаговая кислота защищала 80% животных от заражения гриппом, галловая кислота – на 50%. Защитные свойства отобранных соединений выражались в способности блокировать репродукцию вируса гриппа, оцениваемую по наличию гена матричного белка в образцах легочной ткани инфицированных мышей.

Таким образом, в результате изучения способности исследуемых растительных соединений защищать организм от инфицирования при экспериментальной гриппозной инфекции на модели животных было установлено, что эллаговая кислота и патулетин обладают выраженными профилактическими свойствами, и способны препятствовать развитию гриппозной инфекции при профилактическом приеме данных препаратов.

Благодарности: Исследование выполнено за счет гранта AP05130964 Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Литература

1. World Health Organization (WHO), World Health Statistics 2011. Available from: http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS2011_TOC.pdf.
2. Teles Y.C.F., Souza M.S.R., Vanderlei de Souza M. Sulphated Flavonoids: Biosynthesis, Structures, and Biological Activities // *Molecules*. 2018. V. 23. P. 480. doi:10.3390.
3. Bang S., Li W., Ha T.K.Q., Lee C., Oh W.K., Shim S.H. Anti-influenza effect of the major flavonoids from *Salvia plebeia* R.Br. via inhibition of influenza H1N1 virus neuraminidase // *Nat Prod Res*. 2017. V. 15. P.1-5. doi: 10.1080/14786419.2017.1326042.

UDC 578.832 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-216-218

THE ABILITY OF PHENOLIC ACIDS OF PLANT ORIGIN TO PROTECT THE ORGANISM FROM INFLUENZA INFECTION

Turmagambetova A.S., Bogoyavlenskiy A.P., Alexyuk P.G., Sokolova N.S., Zaitseva I.A., Berezin V.E.

Research and Production Center for Microbiology and Virology
Almaty, Kazakhstan
050010, 105, Bogenbai Batyr Street
e-mail: aichyck@mail.ru

It is shown that gallic acid, ellagic acid and patuletin have pronounced prophylactic properties that neutralize the development of experimental influenza infection.

Key words: plant, phenolic acid, influenza infection, antiviral property

Shift and drift changes in the antigenic structure of influenza virus strains in different regions of the globe, the emergence of influenza virus variants resistant to the main types of drugs that can cause outbreaks of infection among susceptible populations of adolescence and old age lead to an increase in demand for new strategies for the treating of influenza infection. In Kazakhstan influenza and other acute respiratory viral infections account for up to 60% of all infectious diseases [1]. Along with the improvement of vaccines, the path of nonspecific protection of the susceptible population from influenza and other acute respiratory viral infections and emergency prophylaxis during the period of a seasonal increase in the morbidity should be recognized as extremely promising. In this direction an intensive search is being made for biologically active substances of plant origin that have antiviral properties against a wide range of pathogens for the treatment and prevention of influenza and other acute respiratory viral infections [2-3].

The aim of the research was to study the ability of gallic acid, ellagic acid, and patuletin to protect the organism from infection in a model of experimental influenza infection in animals.

The prophylactic effect of the preparations at a dose of 10 mg/kg in relation to the epidemiologically significant strain of the influenza virus A/Almaty/8/98 (H3N2) was studied in a model of white outbred mice.

The prophylactic effect of purified plant compounds was evaluated by the quantifying of influenza virus matrix protein gene in the lungs of mice 7 days after modeling of acute influenza infection with preliminary administration of the studied compounds. The matrix protein gene in the samples was quantified using a TaqMan samples in real-time PCR.

The patuletin showed the most pronounced prophylactic effect (98%). Ellagic acid protected 80% of animals from influenza infection, gallic acid on 50%. The protective properties of the selected compounds were expressed in the ability to block the reproduction of the influenza virus, assessed by the presence of the matrix protein gene in the lung tissue samples of infected mice.

Thus, as a result of studying the ability of the studied plant compounds to protect the organism from infection during the experimental influenza viral infection in animal models it was found that ellagic acid and patuletin have pronounced prophylactic properties and can inhibit the development of influenza infection with the prophylactic use of these preparations.

Acknowledgement: This work was supported by grant AP051 30964 from the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

References

1. World Health Organization (WHO), World Health Statistics 2011. Available from: http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS2011_TOC.pdf.
2. Teles Y.C.F., Souza M.S.R., Vanderlei de Souza M. Sulphated Flavonoids: Biosynthesis, Structures, and Biological Activities // *Molecules*. 2018. V. 23. P. 480. doi:10.3390.
3. Bang S., Li W., Ha T.K.Q., Lee C., Oh W.K., Shim S.H. Anti-influenza effect of the major flavonoids from *Salvia plebeia* R.Br. via inhibition of influenza H1N1 virus neuraminidase // *Nat Prod Res*. 2017. V. 15. P.1-5. doi: 10.1080/14786419.2017.1326042.

УДК 578.832 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-218-220

СТИМУЛЯЦИЯ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ ОБЩЕГО ПРОТИВОВИРУСНОГО ИММУНИТЕТА КОМПЛЕКСНЫМ РАСТИТЕЛЬНЫМ ПРЕПАРАТОМ

Турмагамбетова А.С., Богоявленский А.П., Алексюк М.С., Омиртаева Э.С., Аканова К.С., Березин В.Э.

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»

г. Алматы, Казахстан

050010, ул. Богенбай батыра, 105

e-mail: aichyck@mail.ru

Показано, что активацию генов играющих решающую роль в распознавании РНК вирусов, проникающих в клетку через рецептор-опосредованный эндоцитоз или фагоцитоз можно значительно повысить путем введения в организм неспецифических иммуностимуляторов растительного происхождения, содержащих тритерпен с гликозилированным метоксифлавоноидом.

Ключевые слова: растение, иммуностимулятор, экспрессия гена, метоксифлавоноид

Высокая изменчивость вируса гриппа приводит к его быстрой адаптации к лекарственным средствам и вакцинам, что требует перманентного изменения стратегии и тактики борьбы с гриппозной инфекцией. Изучение факторов, оказывающих влияние на активацию тех или иных звеньев иммунной системы, является одним из направлений подобной стратегии. Установлено, что вирус гриппа распознается тремя различными классами рецепторов PRR: Toll-подобные рецепторы (TLR), RIG-1-подобные рецепторы (RLR) и NOD-подобные рецепторы (NLR) [1, 2]. Изучение механизмов стимуляции генов противовирусного иммунитета, способных повышать резистентность организма к вирусным инфекциям – это важные вопросы фундаментальных исследований в области вирусологии и иммунологии, позволяющие в конечном итоге повысить эффективность не только иммунотерапии вирусных инфекций, но и их вакцинопрофилактики.

Целью исследований являлось изучение стимуляции некоторых генов неспецифического противовирусного иммунитета биологически активными соединениями растительного происхождения для разработки новых лекарственных средств, способных повышать резистентность организма к вирусным инфекциям.

Проведено определение изменений экспрессии некоторых маркеров неспецифического противовирусного иммунитета при введении в организм комбинированного иммуностимулирующего препарата (бетулин в смеси гликозидом изорамнетина или гесперидином) с использованием методов молекулярного анализа.

В качестве маркеров использовали гены TLR3 и TLR7, играющие важную роль в защите организма от вирусов. Для изучения экспрессии указанных выше генов проводили однократную иммунизацию животных комбинированными иммуностимулирующими препаратами в сочетании с очищенными гликопротеидными антигенами (НА, NA) вируса гриппа, штамм А/Алматы/8/98 (H3N2). Через 3 дня у животных собирали макрофаги и методом ПЦР в реальном времени определяли в них уровень экспрессии выбранных генов.

Показано, что уровень экспрессии исследуемых генов по сравнению с контрольной группой повышался 6-ти (TLR7) и 2,5 (TLR3) кратно в случае использования в качестве иммуностимулятора смеси

бетулин - гликозид изорамнетина и 5,5 (TLR7) и 3,8 (TLR3)кратно при введении животным бетулина в смеси с гесперидином.

Гликозид изорамнетина в смеси с бетулином приводит к специфическому увеличению экспрессии генов распознающих одноцепочечные РНК, в то время как комплекс бетулина с гесперидином приводит к повышенной экспрессии генов распознающих двухцепочечные РНК.

Таким образом, показано, что активацию генов играющих решающую роль в распознавании РНК вирусов, которые проникают в клетку через рецептор-опосредованный эндоцитоз или фагоцитоз, можно значительно повысить путем введения в организм неспецифических иммуностимуляторов растительного происхождения, содержащих тритерпен с гликозилированным метоксифлавоноидом.

Благодарности: Исследование выполнено за счет гранта AP05130957 Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Литература

1. Pang I.K., Iwasaki A. Control of antiviral immunity by pattern recognition and the microbiome // *Immunol. Rev.* 2012. V. 245. P. 209–226. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01073.x.
2. Iwasaki A., Pillai P.S. Innate immunity to influenza virus infection // *Nat Rev Immunol.* 2014. V. 14(5). P. 315–328. DOI: 10.1038/nri3665.

UDC 578.832 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-218-220

STIMULATION OF SOME GENES OF GENERAL ANTI-VIRAL IMMUNITY BY COMPLEX PLANT PREPARATION

Turmagambetova A.S., Bogoyavlenskiy A.P., Alexyuk M.S., Omirtaeva E.S., Akanova K.S., Berezin V.E.

Research and Production Center for Microbiology and Virology

Almaty, Kazakhstan

050010, 105, Bogenbai Batyr Street

e-mail: aichyck@mail.ru

It was shown that the activation of genes that play a decisive role in the recognition of RNA of viruses that enter the cell through receptor-mediated endocytosis or phagocytosis can be significantly increased by introducing of nonspecific immunostimulants of plant origin containing triterpene with glycosylated methoxyflavonoid.

Key words: plant, immunostimulant, gene expression, methoxyflavonoid

The high variability of the influenza virus leads to its rapid adaptation to drugs and vaccines which requires a permanent change in the strategy and tactics of influenza infection therapy. The study of factors that influence on the activation of certain parts of immune system is one of the directions of a such strategy. The influenza virus recognized by three different classes of PRR receptors: Toll-like receptors (TLR), RIG-1-like receptors (RLR) and NOD-like receptors (NLR) [1, 2]. The study of the mechanisms of stimulation of antiviral immunity genes that can increase the resistance of organism to viral infections are important questions of basic research in the field of virology and immunology which ultimately make it possible to increase the effectiveness of not only immunotherapy of viral infections, but also their prophylaxis by vaccines.

The aim of the research was to study the stimulation of certain genes of nonspecific antiviral immunity by biologically active compounds of plant origin for development of new preparations that can increase the resistance of organism to viral infections.

The changes in the expression of some markers of nonspecific antiviral immunity were determined after administration of a combined immunostimulating preparation (betulin in a mixture with isorhamnetin glycoside or hesperidin) using the methods of molecular analysis.

The TLR3 and TLR7 genes were used as markers which play an important role in protecting of the organism against viruses. To study the expression of tested genes, animals were immunized once with combined immunostimulating preparations in combination with purified glycoprotein antigens (HA, NA) of influenza virus strain A/Almaty/8/98 (H3N2). 3 days after immunization macrophages were collected from animals and the level of expression of selected genes was determined in real time PCR.

The level of expression of the studied genes compared to the control group increased 6-fold (TLR7) and 2.5-fold (TLR3) after administration of the mixture of betulin - isorhamnetin glycoside, and 5.5-fold (TLR7) and 3.8-fold (TLR3) after animals were immunized by the mixture of betulin with hesperidin.

The mixture of isorhamnetin glycoside with betulin leads to a specific increase in the expression of genes recognizing single-stranded RNAs, while the complex of betulin with hesperidin leads to increase in expression of genes recognizing double-stranded RNAs.

Thus, it was shown that the activation of genes that play a decisive role in the recognition of RNA of viruses that penetrate into the cell through receptor-mediated endocytosis or phagocytosis can be significantly increased by the introducing in to the organism of nonspecific plant origin immunostimulants containing triterpene with glycosylated methoxyflavonoid.

Acknowledgement: This work was supported by grant AP05130957 from the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

References

1. Pang I.K., Iwasaki A. Control of antiviral immunity by pattern recognition and the microbiome // *Immunol. Rev.* 2012. V. 245. P. 209–226. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01073.x.
2. Iwasaki A., Pillai P.S. Innate immunity to influenza virus infection // *Nat Rev Immunol.* 2014. V. 14(5). P. 315–328. DOI: 10.1038/nri3665.

УДК 632.4:541.18 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-220-221

ЗАВИСИМОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФУНГИЦИДНЫХ ПРОТРАВИТЕЛЕЙ ОТ РАЗМЕРА ЧАСТИЦ В ПРЕПАРАТАХ

Улыбина О.В.^{1,2}, Елиневская Л.С.¹, Павлов В.А.¹, Киенская К.И.², Кусков А.Н.²

¹ АО Фирма «Август», Москва, Россия;

² Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия
 129515, г. Москва, ул. Цандера, 6

* e-mail: o.ulybina@avgust.com

Методом размола получены суспензии фунгицида тебуконазола с разным размером частиц, которыми была проведена предпосевная обработка семян пшеницы. Проведены микологические исследования и количественное определение микотоксина методом ВЭЖХ. Показана зависимость противогрибковой активности от размера частиц в препарате.

Ключевые слова: размер частиц, суспензии, тебуконазол, грибковые болезни злаковых, биологическая активность

Препараты на основе тебуконазола широко используются в качестве эффективного средства как в лечебных, так и в профилактических целях при обработке зерновых культур и их семян и действуют на широкий спектр болезней растений [1]. Однако возрастающие потребности в получении качественного посевного материала, резистентность патогенов к классическим фунгицидам, а также ужесточение государственного регулирования средств защиты растений требуют более детального изучения как физико-химических, так и биологических свойств препаратов.

Целью данной работы являлось исследование влияния на биологическую активность такого показателя, как дисперсность или размер частиц действующего вещества в суспензии.

Семена пшеницы были обработаны модельными суспензиями тебуконазола с разным размером частиц, согласно нормам расхода [2]. Для всех образцов методом ВЭЖХ была определена полнота протравливания [3]. Пророщенная из них в лабораторных условиях пшеница искусственно инфицировалась штаммом *Fusarium graminearum*. Для полученных семян была проведена оценка всхожести, зараженности патогеном. Методом ВЭЖХ было установлено содержание микотоксина дезоксиниваленола (ДОН), типичного токсина, выделяемого *F. graminearum*.

В ходе проведенных исследований было установлено, что размер частиц дисперсной фазы влияет на биологическую активность действующего компонента. Сравнением полноты протравливания семян было показано, что суспензионные препараты с меньшим размером частиц способны лучше удерживаться на поверхности зерна. Кроме того, исходя из данных микологического анализа, можно сделать вывод, что при одинаковом количестве действующего вещества на поверхности зерновок, суспензии с более высокой дисперсностью обладают большей биологической фунгицидной активностью.

Литература

1. Гольшин Н. М. Фунгициды. - М.: Колос, 1993. -319 с.
2. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации // Приложение к журналу Защита и карантин растений, 2019, № 4.
3. Елиневская Л.С., Павлов В.А., Белов М.Ю., Водопьянов Е.А, Шишкова М.О., Козин А.И., Тюрина Е.С. Методические указания по определению степени протравливания семян // Приложение к журналу Защита и карантин растений, 2016, № 8.
4. Микотоксины и микотоксикозы // под ред. Д.Диаз. – М.: Печатный город, 2006. -382 с.

UDK 632.4:541.18 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-220-221

DEPENDENCE OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF FUNGICID FOR SEED TREATMENT ON PARTICLE SIZE

Ulybina O.V.^{1,2}, Elinevskaya L.S.¹, Pavlov V.A.¹, K.I. Kienskaya², Kuskov A.N.²¹ JSC «August» Inc., Moscow, Russian Federation;² D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation
129515, Moscow, 6 Tsandera str.

* e-mail: o.ulybina@avgust.com

Wheat seeds were treated with suspensions of tebuconazole with different particle sizes which were obtained by wet-milling method. Mycological studies and quantitative determination of mycotoxin by HPLC were carried out. The dependence of antifungal activity on the particle size in the preparation is shown.

Key words: particle size, suspensions, tebuconazole, cereal fungal diseases, biological activity

Tebuconazole formulations are widely used as an effective agent for both therapeutic and prophylactic purposes in the treatment of crops and their seeds and act on a wide range of plant diseases. [1] However, the growing demand for high-quality seed, the resistance of pathogens to classical fungicides, and the tightening of state regulation of plant protection products require a thorough study of both the physicochemical and biological properties of the formulations.

The aim of this work was to study the influence of particle size and distribution of the active ingredient in suspension on the biological activity.

Wheat seeds were treated with model suspensions of tebuconazole with different particle sizes, according to application rates [2]. For all samples, the seed loading was determined by HPLC [3]. Wheat germinated from them in the laboratory was artificially infected with a strain of *Fusarium graminearum*. For the seeds obtained, germination and pathogen infection were assessed. The content of mycotoxin deoxynivalenol (DON), a typical toxin secreted by *F. graminearum*, was determined by HPLC.

In the course of the studies, it was found that the particle size of the dispersed phase affects the biological activity of the active component. By comparing the seed loading, it was shown that suspension preparations with a smaller particle size are better able to hold on the grain surface. In addition, based on the data of mycological analysis, we can conclude that with the same amount of active substance on the surface of the grains, suspensions with a higher dispersion have greater biological fungicidal activity.

References

1. Golyshin N. M. *Fungicides*. - M.: Kolos, 1993. -319 p.
2. *List of pesticides and agrochemicals approved for use in the Russian Federation // Appendix to the journal Protection and Plant Quarantine*, 2019, No. 4.
3. Elinevskaya L.S., Pavlov V.A., Belov M.Yu., Vodopyanov E.A., Shishkova M.O., Kozin A.I., Tyurina E.S. *Guidelines for determining the seed loading // Appendix to the journal Protection and Plant Quarantine*, 2016, No. 8.
4. *Mycotoxins and mycotoxicoses // D. Diaz*. - M.: Pechatniy gorod, 2006. -382 p.

УДК 57.083.383 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-222-223

УЛЬТРАЗВУКОВАЯ ПРЕДОБРАБОТКА СУСПЕНЗИИ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИГЕНСОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ

Устинова В.А., Ключкина В.И., Анисина О.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности
 141103, Московская область, г.Щелково, ул. Жуковского, д. 6, кв. 115
 e-mail: klyukinavi@yandex.ru

Исследовано влияние ультразвуковой обработки вирусосодержащей суспензии на чистоту антигенных препаратов вируса бешенства. Установлено, что максимальный выход свободного от тканевых и культуральных белков вируса наблюдается при обработке 10-20% вирусосодержащей суспензии при температуре не выше 8-10°C, продолжительности обработки 3-5 мин и мощности 30-40 кГц.

Ключевые слова: ультразвуковая обработка, вирус бешенства, диагностические тест-системы.

В ряде технологий изготовления диагностических тест-систем на основе метода флюоресцирующих антител (МФА), иммуноферментного анализа (ИФА), реакции диффузионной преципитации (РДП) и иммунохроматографического анализа (ИХА) предлагаются многостадийные схемы физико-химической или иммунохроматографической очистки вируса бешенства, а также его основных иммунодоминантных антигенов: нуклеопротеина (белок N) и гликопротеина (белок G). Для повышения эффективности очистки вируса бешенства из инактивированной культуральной суспензии вируса бешенства штамма «Щелково-51» и мозговой ткани овец, инфицированной штаммом «Овечий-ВГНКИ», разработана двух стадийная технология: 1 этап - ультразвуковая дезинтеграция суспензии; 2 этап - удаление балластных белков центрифугированием.

В ходе исследований установлено, что на степень очистки вируса влияет концентрация суспензии, время и интенсивность ультразвукового воздействия. В изучаемом интервале концентраций культуральной и тканевой суспензий наблюдался схожий характер кривой зависимости удаляемого белка от продолжительности обработки.

Была достигнута максимальная степень очистки 10% вирусосодержащей суспензии культуры клеток (93,2%) и 20% суспензии ткани мозга (97,4%) диспергированием при 30-40 кГц, температуре не выше 10°C и продолжительности обработки 3 и 5 минут соответственно. Выход белков нуклеопротеина, полученного деструкцией вирионов очищенного культурального вируса бешенства тритоном X-100 и последующим отделением белка в градиенте 10-60% сахарозы, составил 59,2%, гликопротеина - 40,8%.

Показано, что предложенная технология сохраняет антигенные и иммуногенные свойства препаратов очищенного вируса бешенства, гликопротеина и нуклеопротеина. Методом непрямого ИФА установлена эффективность использования в качестве антигена очищенного вируса бешенства и белка G для определения уровня поствакцинального иммунитета у животных, привитых против бешенства. Показано, что сыворотка к группоспецифическому антигену вируса бешенства нуклеопротеину (белок N) с высокими титрами преципитирующих и комплементсвязывающих антител пригодна для конструирования тест-систем для диагностики бешенства методами МФА, ИФА, РДП и ИХА.

Таким образом, ультразвуковая предобработка вирусосодержащей суспензии существенно повышает выход очищенного вируса бешенства, нуклеопротеина и гликопротеина, которые используются в качестве антигенов тест-систем для диагностики бешенства и приготовления диагностических сывороток.

ULTRASONIC PROCESSING OF RABIES VIRUS SUSPENSION FOR OBTAINING ANTIGEN-CONTAINING PREPARATIONS FOR DIAGNOSTIC TEST SYSTEMS

Ustinova V.A., Klyukina V.I., Anisina O.V.

Federal State Budget Scientific Institution Russian National Research and Technological Institute of Biological Industry

141103, Moscow Region, Shchelkovo, Zhukovsky st., h. 6, apt. 115

e-mail: klyukinavi@yandex.ru

The effect of ultrasonic treatment of a virus-containing suspension on the purity of the rabies virus antigenic preparations was studied. It was found that the maximum yield of free of tissue and culture proteins virus is observed when processing 10-20% of the virus-containing suspension at a temperature not exceeding 8-10°C, processing time 3-5 min and a frequency of 30-40 kHz.

Key words: ultrasonic treatment, rabies virus, diagnostic test systems.

Several technologies for the production of diagnostic test systems based on the method of fluorescent antibodies (MFA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), diffusion precipitation reaction (DPR) and immunochromatographic analysis (IHA) offer multistage schemes for physicochemical or immunochromatographic purification of the rabies virus, as well as its main immunodominant antigens: nucleoprotein (protein N) and glycoprotein (protein G). To increase the efficiency of purification of rabies virus from an inactivated culture suspension of rabies virus of the Schelkovo-51 strain and the brain tissue of sheep infected with the strain of Ovine-VGNKI, two-stage technology was developed: Stage 1 - ultrasonic disintegration of the suspension; Stage 2 - removal of ballast proteins by centrifugation.

In the course of the research, it was found that the degree of purification of the virus is affected by the concentration of the suspension, time and intensity of ultrasound exposure. In the studied range of concentrations of culture and tissue suspensions, similar nature of the removed protein on the duration of treatment dependence curve was observed.

The maximum degree of purification of a 10% virus-containing suspension of cell culture (93.2%) and a 20% brain tissue suspension (97.4%) was achieved by dispersing at 30–40 kHz, at a temperature not exceeding 10°C, and processing time of 3 and 5 minutes, respectively. The yield of the nucleoprotein proteins obtained by the destruction of the purified cultural rabies virus virions by Triton X-100 and subsequent protein separation in the 10-60% sucrose gradient was 59.2%, of the glycoprotein - 40.8%.

It is shown that the proposed technology preserves the antigenic and immunogenic properties of the purified rabies virus, glycoprotein and nucleoprotein preparations. Using the indirect ELISA method, the effectiveness of using purified rabies virus and protein G as an antigen to determine the level of post-vaccination immunity in animals vaccinated against rabies was established. It was shown that the serum to the group-specific antigen of rabies virus nucleoprotein (protein N) with high titers of precipitating and complement-binding antibodies is suitable for the construction of test systems for the diagnosis of rabies by the methods of MFA, ELISA, RDP and IHA.

Thus, ultrasonic processing of the virus-containing suspension significantly increases the yield of the purified rabies virus, nucleoprotein and glycoprotein, which are used as test systems antigens for the diagnosis of rabies and the preparation of diagnostic sera.

БИОФАРМАЦЕВТИКА НА БАРСКОМ ЛУГУ 2020: НАУЧНЫЕ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ТRENДЫ РАЗВИТИЯ СОВРЕМЕННЫХ ФЕРМЕНТНЫХ И АНТИТЕЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

BIOPHARMACY ON BARSKY LUG 2020: SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL TRENDS IN DEVELOPMENT OF MODERN FERMENTAL AND IMMUNE DRUGS

Руководитель

*Р.А. Хамитов д.м.н., профессор, генеральный директор ООО «МБЦ «Генериум» /
R.A. Khamitov professor, doctor of science (Medicine), general director of Generium*

| | |
|---|-----|
| 1. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФИЛЬТРОВ РАЗНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ДЛЯ ОСВЕЩЕНИЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ КЛЕТОК СНО | 224 |
| E.V. Voronina, N.V. Lobanova, I.N. Trusova, A.V. Kholodova, R.A. Marygin, Yu.A. Seregin..... | 224 |
| AN EFFICIENCY COMPARISON OF CLARIFYING FILTERS DURING THE HARVEST OF CHO CELL CULTURE FLUID | 225 |
| E.V. Voronina, N.V. Lobanova, I.N. Trusova, A.V. Kholodova, R.A. Marygin, Yu.A. Seregin..... | 225 |
| 2. ИЗУЧЕНИЕ ДЕЗАМИДИРОВАНИЯ АНТИТЕЛ МЕТОДАМИ ВЭЖХ Олесова К. А., Машченко З. Е., Петров А.В. | 226 |
| STUDY OF ANTIBODY DEAMIDATION BY HPLC METHODS Olesova K. A., Mashchenko Z. E., Petrov A. V. | 227 |
| 3. МИКРОМИЦЕТЫ ASPERGILLUS RAPERI И SAROCLADIUM STRICTUM КАК ПРОДУЦЕНТЫ ФЕРМЕНТОВ С АКТИВАТОРНОЙ К ПЛАЗМИНОГЕНУ АКТИВНОСТЬЮ УРОКИНАЗНОГО ТИПА | 228 |
| Очнева А. Г., Корниенко Е. И., Осмоловский А. А. | 228 |
| MICROMICETES ASPERGILLUS RAPERI AND SAROCLADIUM STRICTUM AS PRODUCERS OF ENZYMES WITH UROKINASE-LIKE PLASMINOGEN ACTIVATOR ACTIVITY | 229 |
| Ochneva A.G., Kornienko E.I., Osmolovskiy A.A. | 229 |

УДК 615.33(076.5) (075.8) DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-224-226

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФИЛЬТРОВ РАЗНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ДЛЯ ОСВЕЩЕНИЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ КЛЕТОК СНО

Е.В. Воронина, Н.В. Лобанова, И.Н. Трусова, А.В. Холодова, Р.А. Марыгин, Ю.А. Серегин

ООО «ФАРМАПАРК», 117545, Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1
e-mail: voronina@pharmapark.ru

Ключевые слова: культуральная жидкость, фильтрация, СНО, освещение

В настоящей работе сравнивали мутность культуральной жидкости (КЖ) и объем осветленной КЖ, полученной в результате использования девяти фильтров с одинаковой площадью различных производителей и их комбинаций.

Цель исследования. Сравнить эффективность осветляющих фильтров разных производителей.

Материалы и методы. Использовали культуральную жидкость (25 млн клеток/мл, жизнеспособность 85%), полученную за один цикл продукции с периодическим внесением подпитки в биореакторе с рабочим объемом 50 л. Осветление осуществляли методом фильтрации (25см²), используя Sartoclear PB1, Sartoclear PB2 (Sartorius, Германия); Supracap 50 PDP8, Supracap 50 PDK7 (Pall, США); ZetaPlus 10SP02, ZetaPlus 30SP02, ZetaPlus 60SP02 (3M, США); Millistak MicroPod D0HC, Millistak MicroPod CE20 (Millipore, США). Перед нанесением КЖ фильтры промывали водой для инъекций, затем вытесняли

остаток воды сжатым воздухом при давлении на входе не более 0,5 бар. Фильтрацию осуществляли при скорости потока 7 мл/мин согласно рекомендациям производителей 25 мл/100 см². При получении каждой порции фильтрата объемом 30 мл измеряли мутность, используя мутномер HI98713-02 (Hanna Instruments, США), и отмечали сопутствующее давление на установленном манометре перед фильтром. При достижении мутности фильтрата более 200 FNU или давления более 1,5 бар останавливали эксперимент.

Результаты. Мутность неосветленной КЖ составила более 1000 FNU. По полученным данным были построены графики зависимости давления (рис.1) и мутности (рис.2) от объема профильтрованной КЖ.

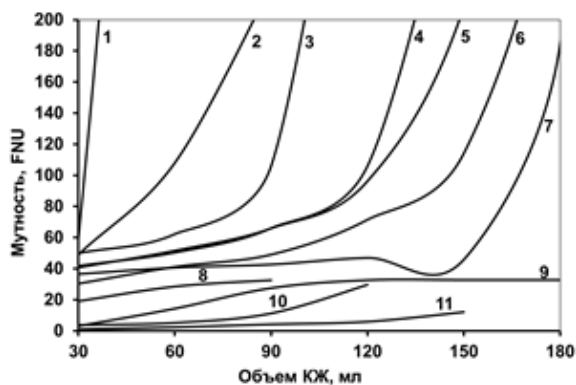


Рис. 1.

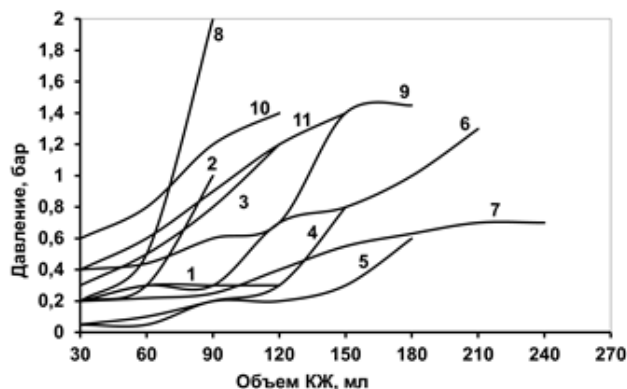


Рис. 2.

Рис.1 и 2. График зависимости мутности и давления в линии фильтрации от объема профильтрованной КЖ: (1) Millistak MicroPod CE20; (2) Supracap 50 PDK7; (3) Millistak MicroPod D0HC; (4) ZetaPlus 30SP02; (5) ZetaPlus 10SP02; (6) Supracap 50 PDP8; (7) Sartoclear PB1; (8) Sartoclear PB2; (9) ZetaPlus 60SP02; (10) последовательно ZetaPlus 30 и ZetaPlus 60; (11) последовательно ZetaPlus 10 и ZetaPlus 60

Вывод. В результате сравнительной оценки эффективности осветляющей фильтрации было показано, что ZetaPlus 60SP02 (№ 9 на рис.1 и 2) обеспечивает максимальное количество фильтрата объемом 180 мл с концентрацией частиц 24 FNU при давлении не более 1,5 бар и является выгодным вариантом подготовки КЖ для очистки в рамках крупномасштабного биотехнологического производства.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-224-226

AN EFFICIENCY COMPARISON OF CLARIFYING FILTERS DURING THE HARVEST OF CHO CELL CULTURE FLUID

E.V. Voronina, N.V. Lobanova, I.N. Trusova, A.V. Kholodova, R.A. Marygin, Yu.A. Seregин

FARMAPARK LLC, 117545, Russia, Moscow, 1st Dorozhniy proezd, 1
e-mail: voronina@pharmapark.ru

Key words: culture fluid, filtration, CHO, clarification

The turbidity of the culture fluid (CF) and the volume of clarified CF obtained by using nine different filters with the same area (25 cm²) and their combinations were compared.

Purpose of the study. An efficiency comparison of clarifying filters from different filters.

Materials and methods. CHO cells were grown in fed batch culture (25 million cells/mL, viability 85 %) at the 50-L scale using chemically defined media. Clarification of harvested cell culture was performed by filters: Sartoclear PB1, Sartoclear PB2 (Sartorius, Germany); Supracap 50 PDP8; Supracap 50 PDK7 (Pall, USA); ZetaPlus 10SP02, ZetaPlus 30SP02, ZetaPlus 60SP02 (3M, United States); Millistak MicroPod D0HC, Millistak MicroPod CE20 (Millipore, USA). Before the start of filtration the filters wetted and flushed with purified water and dried up by air at 0.5 bar. Clarification was carried out at a constant flux of 7 mL/min (25 mL/100 cm²). Turbidity of the each clarified CF fraction (30 mL) was measured using a HI98713-02 turbidimeter (Hanna Instruments, USA). Pressure rise was measured using an installed gauge in front of the filter. The test endpoint was taken as either a filter pressure rise of 1.5 bar and turbidity of the CF of more than 200 FNU.

Results. Based on the obtained data, we plotted the dependencies of pressure (Fig. 1) and turbidity (Fig. 2) on the volume of clarified CF.

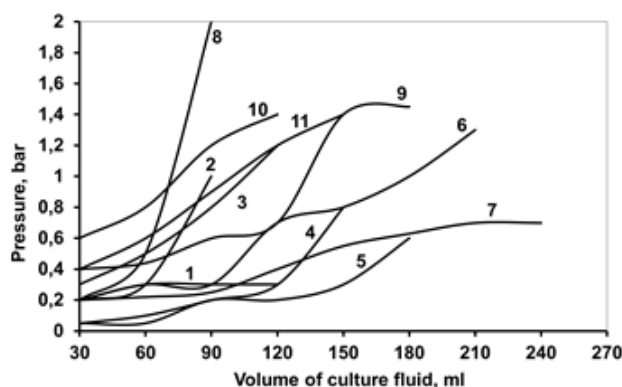


Fig. 1

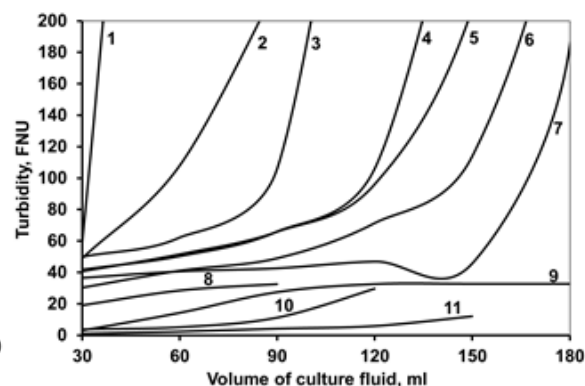


Fig. 2

Turbidity and pressure rise vs. CF volume: (1) Millistak MicroPod CE20; (2) Supracap 50 PDK7; (3) Millistak MicroPod D0HC; (4) ZetaPlus 30SP02; (5) ZetaPlus 10SP02; (6) Supracap 50 PDP8; (7) Sartoclear PB1; (8) Sartoclear PB2; (9) ZetaPlus 60SP02; (10) sequentially ZetaPlus 30 and ZetaPlus 60; (11) sequentially ZetaPlus 10 and ZetaPlus 60.

Conclusion. As a result of the comparative assessment it was shown that ZetaPlus 60SP02 (No. 9 in Figs. 1 and 2) provides the maximum volume of clarified CF of 180 mL and a particle concentration of 24 FNU at a pressure of no more than 1.5 bar. The use of this filter is an advantageous approach for clarified CF obtaining within the framework of large-scale biotechnological production.

УДК 57.088.5 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-226-228

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЗАМИДИРОВАНИЯ АНТИТЕЛ МЕТОДАМИ ВЭЖХ

Олесова К. А., Машенко З. Е., Петров А. В.

Самарский государственный технический университет, г. Самара, РФ
 e-mail: ksyuwa@rambler.ru

Проведено исследование дезамидированных антител различными методами ВЭЖХ. Описаны изменения заряда различных антител, с помощью СЕХ и появление минорных пиков на хроматограммах, с помощью НИС и RPC.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), дезамидирование, моноклональное антитело.

Высокая специфичность и разнообразие эффекторных функций позволяет успешно использовать препараты на основе рекомбинантных антител в лечении онкологических и аутоиммунных заболеваний. Сложность и гетерогенность молекул, обусловленная различными посттрансляционными модификациями, антител требует тщательного анализа. В частности, дезамидированные изоформы антител могут обладать сниженной биологической активностью и быть менее стабильны при хранении.

Целью настоящего исследования является изучение дезамидирования антител методами ВЭЖХ. В рамках цели были решены следующие задачи:

- 1) провести дезамидирование различных коммерческих препаратов на основе рекомбинантных антител;
- 2) оценить хроматографические профили данных белков, полученных с помощью катионообменной (СЕХ), гидрофобной (НИС) и обращенно-фазовой ВЭЖХ (RPC);
- 3) сравнить полученные разными методами результаты и сопоставить их с теоретическими данными о сайтах дезамидирования, предсказанными на основании первичной структуры белка.

Исследовали препараты Герцептин®, Хумира®, Авастин® и Перьета®. Дезамидирование проводили при pH 9,0 и температуре 37 °C. Через 6, 24, 48 и 120 часов отбирали образцы для последующего сравнения с интактным белком. Анализ проводили с помощью ВЭЖХ-системы Prominence (Shimadzu). Для предсказания количества сайтов дезамидирования аминокислотные последовательности антител, взятые из базы drugbank.ca, анализировали с использованием онлайн-сервиса Protpi.ch.

Результаты СЕХ приведены в таблице 1.

Таблица 1.

| Препарат | Содержание кислых изоформ (%) | | | | | Количество сайтов дезамидирования |
|-----------|-----------------------------------|------|-------|-------|-------|-----------------------------------|
| | Продолжительность дезамидирования | | | | | |
| | 0 ч | 6 ч | 1 сут | 2 сут | 5 сут | |
| Герцептин | 22,8 | 36,1 | 69,7 | 89,6 | 99,6 | 6 |
| Хумира | 15,2 | 20,3 | 33,3 | 49,1 | 55,3 | 4 |
| Авастин | 17,6 | 25,6 | 36,2 | 49,7 | 72,3 | 4 |
| Перьета | 10,4 | 36,5 | 38,4 | 49,5 | 76,3 | 4 |

Для всех изученных антител отчетливо наблюдается постепенный рост содержания кислых изоформ с увеличением продолжительности дезамидирования. На 5 сутках инкубирования у Герцептина, имеющего 6 возможных сайтов дезамидирования, пик главной изоформы отсутствует, в то время, как у остальных антител с 4 возможными сайтами, содержание кислых форм находится в диапазоне 55-76 %.

Анализ образцов Герцептина с помощью HIC показал рост площади пиков более гидрофобных, по сравнению с главным, с увеличением продолжительности дезамидирования. На хроматограмме 5-суточного образца наблюдается расширение главного пика.

RPC исследованных образцов показала увеличение площади предпика во всех изученных антителах на протяжении инкубирования, наиболее отчетливо выраженное у Хумиры.

По результатам проделанной работы можно сформулировать следующие выводы:

- 1) наиболее наглядным методом количественного изучения дезамидирования является CEX;
- 2) прирост площадей более гидрофобных пиков при анализе на HIC и предпиков при анализе на C8 отчетливо коррелирует с ростом кислых изоформ на CEX, что позволяет с определенной уверенностью определить их принадлежность к дезамидированным формам антител.

UDC 57.088.5 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-226-228

STUDY OF ANTIBODY DEAMIDATION BY HPLC METHODS

Olesova K. A., Mashchenko Z. E., Petrov A. V.

Samara state technical University, Samara, Russia

Deamidated antibodies were studied by various HPLC methods. Changes in the charge of various antibodies are described by CEX, as well as the appearance of minor peaks on chromatograms by HIC and RPC.

Key words: high-performance liquid chromatography (HPLC), deamidation, monoclonal antibody.

The high specificity and diversity of effector functions allow the successful use of drugs based on recombinant antibodies in the treatment of cancer and autoimmune diseases. The complexity and heterogeneity of molecules, caused by various post-translational modifications of antibodies, require careful analysis. In particular, deamidated antibody isoforms may have reduced biological activity and be less stable during storage.

The purpose of this research is to study the deamidation of antibodies by HPLC methods. Within the framework of the goal, the following tasks were solved:

- 1) perform deamidation of various commercial drugs based on recombinant antibodies;
- 2) evaluate the chromatographic profiles of these proteins obtained using cation exchange (CEX), hydrophobic (HIC), and reverse-phase HPLC (RPC);
- 3) compare the results obtained by different methods and compare them with the theoretical data on deamidation sites predicted based on the primary structure of the protein.

The drugs Herceptin®, Humira®, Avastin® and Perjeta® were studied. Deamidation was performed at a pH of 9.0 and a temperature of 37 °C. After 6, 24, 48, and 120 hours, samples were taken for subsequent comparison with the intact protein. The analysis was performed using Prominence HPLC system (Shimadzu) and WCX (Agilent) columns with detection at 280 nm with pretreatment of the proteins with carboxypeptidase B; HIC (Agilent) with fluorescence detection at 278 / 350 nm; or Zorbax C8 (Agilent) with detection at 225 nm. To predict the number of deamidation sites, the amino acid sequences of antibodies taken from the drugbank.ca database were analyzed using the Protpi.ch online service.

The CEX chromatographic results are shown in Table 1

Table 1.

| Drug | The content of acidic isoforms (%) | | | | | Number of deamidation sites |
|-----------|------------------------------------|------|-------|-------|------|-----------------------------|
| | Duration of deamidation | | | | | |
| | 0 h | 6 h | 1 day | 2 day | 5day | |
| Herceptin | 22,8 | 36,1 | 69,7 | 89,6 | 99,6 | 6 |
| Humira | 15,2 | 20,3 | 33,3 | 49,1 | 55,3 | 4 |
| Avastin | 17,6 | 25,6 | 36,2 | 49,7 | 72,3 | 4 |
| Perjeta | 10,4 | 36,5 | 38,4 | 49,5 | 76,3 | 4 |

For all the antibodies studied, it is clear that a gradual increase in the content of acid isoforms with an increase in the duration of deamidation. At 5 days of incubation, Herceptin, which has 6 possible deamidation sites, does not have a peak of the main isoform, while the other antibodies with 4 possible sites have content of acidic forms in the range of 55-76 %.

HIC analysis of Herceptin samples showed an increase in the area of peaks more hydrophobic, compared with the main one, with an increase in the duration of deamidation. The chromatogram of the 5-day sample shows widening of the main peak.

The RPC of the studied samples showed an increase in the pre-peak area in all studied antibodies during incubation, the most prominent changes were detected in Humira.

Based on the results of this paper, the following conclusions can be formulated:

- 1) the most obvious method of a quantitative study of deamidation is CEX;
- 2) the increase in the areas of more hydrophobic peaks in the analysis by HIC and the pre-peaks in the analysis by RPC clearly correlates with the growth of acid isoforms on CEX, which allows us to suggest with certainty their belonging to deamidated forms of antibodies.

УДК 577.152.34 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-228-230

МИКРОМИЦЕТЫ *ASPERGILLUS RAPERI* И *SAROCLADIUM STRICTUM* КАК ПРОДУЦЕНТЫ ФЕРМЕНТОВ С АКТИВАТОРНОЙ К ПЛАЗМИНОГЕНУ АКТИВНОСТЬЮ УРОКИНАЗНОГО ТИПА

Очнева А. Г., Корниенко Е. И., Осмоловский А. А.

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
 125480, Москва, Ленинские горы, д. 1, корп. 12
 e-mail: aleksochneva@yandex.ru

Получены данные по общей протеолитической активности *Aspergillus raperi* и *Sarocladium strictum* и по протеолитической активности по отношению к основным белкам системы гемостаза (специфическая активность). Показано, что *Sarocladium strictum* является более перспективным штаммом-продуцентом ферментов с активаторной к плазминогену активностью урокиназного типа в связи с высокой специфичностью данной активности.

Ключевые слова: протеолитические ферменты; система гемостаза; тромболитики; микромицеты.

В настоящее время, по оценкам ВОЗ, тромболитические осложнения после сердечно-сосудистых заболеваний являются наиболее распространенными причинами смерти в мире. Пациенты с такими осложнениями остро нуждаются в своевременной и эффективной терапии. В результате клинических исследований было показано, что терапия тромболитическими средствами является наиболее эффективной и поэтому она наиболее предпочтительна. Современные тромболитические препараты могут вызывать острые аллергические реакции, могут быть нейротоксичны, могут вызывать побочные кровотечения и их цена сравнительно высока для российского потребителя. Соответственно, задача создания эффективного локального тромболитика с низкой стоимостью по-прежнему актуальна для практической медицины.

В ряде исследований было показано, что микромицеты продуцируют ферменты с активностями факторов системы гемостаза, то есть способные активировать естественные каскады тромболизиса, усилить антикоагулянтный эффект или, наоборот, стимулировать тромбообразование. В связи с удобным и

дешевым способом наработки таких ферментов, встал вопрос поиска ферментов микромицетов с высокой специфичностью к одному из субстратов системы гемостаза в связи с перспективой использования такого фермента для терапии.

В ходе исследования были изучены ферменты продуцентов *Aspergillus raperi* и *Sarocladium strictum* с оценкой ферментативной активности. В качестве целевой активности была выбрана прямая активность к плазминогену урокиназного типа – т.е. способность запускать естественный фибринолитический каскад. Культивирование микромицетов проводили в глубинных условиях с использованием двухстадийного культивирования (наработки биомассы культуры в посевной среде с последующим переносом культуры в ферментационную для наработки продукта). Затем оценивали общую протеолитическую активность и активность по отношению к белкам системы гемостаза. Для оценки общей протеолитической активности использовали нативный белок – казеин. Активность ферментов определяли как количество свободного тирозина (Тур) в супернатанте (после проведения реакции с культуральной жидкостью и казеином) на мл на единицу времени. Активность по отношению к белкам системы гемостаза выявляли по расщеплению специфических хромогенных пептидных субстратов. Активность ферментов определяли как количество свободного пара-нитроанилина (рНА) на мл на единицу времени после проведения реакции.

Было установлено, что ферменты *S. strictum* обладали высокой прямой активностью к плазминогену по урокиназному типу – $107,9 \times 10^{-3}$ мкмоль рНА/(мл×мин). Кроме того, протеазы проявили тромбиноподобную (94×10^{-3} мкмоль рНА/(мл×мин)), плазминоподобную ($75,8 \times 10^{-3}$ мкмоль рНА/(мл×мин)) и казеинолитическую (400 мкмоль Тур/(мл×мин)) активность. Ферменты *A. raperi* также проявили высокие значения прямой активностью к плазминогену (урокиназного типа) – $74,2 \times 10^{-3}$ мкмоль рНА/(мл×мин), тромбиноподобной (114×10^{-3} мкмоль рНА/(мл×мин)), плазминоподобной (97×10^{-3} мкмоль рНА/(мл×мин)) и казеинолитической (91 мкмоль Тур/(мл×мин)) активности.

Таким образом, было показано, что протеазы, образуемые *S. strictum* обладали более выраженной прямой активностью к плазминогену (урокиназного типа), в отличие от ферментов *A. raperi*. Микромицет *S. strictum* может быть отобран как перспективный продуцент ферментов тромболитического действия, как в связи с простотой получения препарата и высокой активностью к плазминогену (урокиназного типа), так и высокой специфичностью действия.

Литература

1. Корниенко Е. И., Кокаева Л. Ю., Биланенко Е. Н. и др. *Sarocladium strictum* – перспективный продуцент протеолитических ферментов с выраженной фибринолитической активностью // Микология и фитопатология. – 2020. – Т. 54, № 3. – С. 206–213.

UDC 577.152.34 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-228-230

MICROMICETES *ASPERGILLUS RAPERI* AND *SAROCLADIUM STRICTUM* AS PRODUCERS OF ENZYMES WITH UROKINASE-LIKE PLASMINOGEN ACTIVATOR ACTIVITY

Ochneva A.G., Kornienko E.I., Osmolovskiy A.A.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
125480, Moscow, Leninskie gory, house 1, building 12
e-mail: aleksochneva@yandex.ru

Data were obtained on the general proteolytic activity of *Aspergillus raperi* and *Sarocladium strictum* and on proteolytic activity in relation to the main proteins of the hemostasis system (specific activity). It has been shown that *Sarocladium strictum* is a more promising strain producing enzymes with urokinase-like plasminogen activator activity due to the high specificity of this activity.

Key words: proteolytic enzymes; hemostatic system; thrombolytics; micromycetes.

Nowadays, according to WHO estimates, thrombolytic complications of cardiovascular disease are the most common causes of death in the world. Patients with these complications are in dire need of timely and effective therapy. As a result of clinical studies, it has been shown that thrombolytic agents therapy is the most effective and therefore the most preferable. Modern thrombolytic drugs can cause acute allergic reactions, can be neurotoxic, can cause side bleedings and their price is relatively high for the Russian consumer. Accordingly, the use of an effective local thrombolytic agent is still relevant for practical medicine.

A number of studies have shown that micromycetes produce enzymes by active factors of the hemostatic system, which promotes the activation of the thrombolysis cascade, enhances the anticoagulant effect, or, conversely, stimulates thrombus formation. In connection with the use of this method of enzymes, micromycetes with high specificity to one of the substrates of the hemostatic system in the prospect of using such an enzyme for treatment.

In the course of the study, the enzymes of the producers *Aspergillus raperi* and *Sarocladium strictum* were studied with an assessment of the enzymatic activity. As the activity, we chose the direct activity to plasminogen of the urokinase type, i.e. the ability to trigger a natural fibrinolytic cascade. Cultivation of micromycetes was carried out in submerged conditions using a two-stage cultivation (biomass production of the culture in the seed medium with subsequent transfer of the culture to the fermentation medium for ferments production). The total proteolytic activity and activity in relation to proteins of the hemostatic system were evaluated. To assess the overall proteolytic activity, use the native protein - casein. The enzyme activity was determined as the amount of free tyrosine (Tyr) in the supernatant (after reaction with the culture liquid and casein) per ml per unit time. The activity towards proteins of the hemostasis system was detected by the cleavage of specific chromogenic peptide substrates. Enzyme activity was defined as the amount of free para-nitroaniline (pNA) per ml per unit time after reaction.

It was found that *S. strictum* enzymes have a high direct activity to plasminogen by the urokinase type - $107.9 \times 10^{-3} \mu\text{mol pNA} / (\text{ml} \times \text{min})$. In addition, proteases showed thrombin-like ($94 \times 10^{-3} \mu\text{mol pNA} / (\text{ml} \times \text{min})$), plasmin-like ($75.8 \times 10^{-3} \mu\text{mol pNA} / (\text{ml} \times \text{min})$) and caseinolytic ($400 \times 10^{-3} \mu\text{mol Tyr} / (\text{ml} \times \text{min})$) activity. Enzymes *A. raperi* also showed high values of direct activity to plasminogen (urokinase type) - $74.2 \times 10^{-3} \mu\text{mol pNA} / (\text{ml} \times \text{min})$, thrombin-like ($114 \times 10^{-3} \mu\text{mol pNA} / (\text{ml} \times \text{min})$), plasmin-like ($97 \times 10^{-3} \mu\text{mol pNA} / (\text{ml} \times \text{min})$) and caseinolytic ($91 \times 10^{-3} \mu\text{mol Tyr} / (\text{ml} \times \text{min})$) activity. Thus, it was shown that proteases formed by *S. strictum* had a more pronounced direct activity to plasminogen (urokinase-like), in contrast to the enzymes of *A. raperi*. The micromycete *S. strictum* can be selected as a promising producer of thrombolytic enzymes, both due to the use of the drug and high activity to plasminogen (urokinase-like), and high specificity of action.

References

1. Kornienko E. I., Kokaeva L. Yu., Bilanenko E. N., et al. *Sarocladium strictum* is a promising producer of proteolytic enzymes with pronounced fibrinolytic activity // *Mycology and Phytopathology*. – 2020. – T. 54, No. 3. – P. 206–213.

ОТ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ К ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЕ

FROM CELL TECHNOLOGIES TO PERSONALIZED MEDICINE

Руководитель

А.В. Васильев член-корреспондент РАН, профессор, д.б.н., директор Института Биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН /

A.V. Vasilev corresponding member of RAS, professor, doctor of science (Biology), director of Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences

| | |
|--|-----|
| 1. ОЦЕНКА ФУНКЦИИ CFTR-КАНАЛА И ОТВЕТОВ НА МОДУЛЯТОРЫ У БОЛЬНЫХ МУКОВИЦИДОЗОМ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ ВАРИАНТОМ F508DEL Н.В.Булатенко, А.С.Ефремова, Т.Б.Бухарова, Н.В.Петрова, Н.Ю.Каширская, Ю.Л.Мельяновская, Е.И.Кондратьева, Д.В.Гольдштейн | 232 |
| EVALUATION OF CFTR CHANNEL FUNCTION AND RESPONSES TO MODULATORS FOR CYSTIC FIBROSIS PATIENTS WITH GENETIC VARIANT F508DEL N.Bulatenko, A.Efremova, T.Bukharova, N.Petrova, N.Kashirskaya, Y.Melyanovskaya, E.Kondratyeva, D.Goldstein | 233 |
| 2. ИНГИБИТОР ASIC1А МАМБАЛГИН-2 ТОРМОЗИТ РОСТ КЛЕТОК ЛЕЙКЕМИИ, ВЫЗЫВАЯ АРЕСТ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА М. Л. Бычков, М. А. Шулепко, В. Ю. Васильева, А. В. Сударикова, М. П. Кирпичников, Е. Н. Люкманова..... | 234 |
| ASIC1A INHIBITOR MAMBALGIN-2 SUPPRESSES GROWTH OF LEUKEMIA CELLS BY CELL CYCLE ARREST M.L. Bychkov, M.A. Shulepko, V.Y. Vasileva, A.V. Sudarikova, M.P. Kirpichnikov E.N. Lyukmanova | 235 |
| 3. ПЕРСПЕКТИВА ПРИМЕНЕНИЯ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЛИ ИХ СЕКРЕТОМА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ А.О. Монова, Г.Д. Сагарадзе, Н.А. Басалова, В.И. Кирпатовский, Д.А. Охоботов, П.П. Нибирицкий, О.А. Григорьева, В.С. Попов, А.А. Камалов, А.Ю. Ефименко | 235 |
| A PERSPECTIVE ON APPLICATION OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS OR THEIR SECRETOME-BASED PRODUCTS FOR TREATING MALE INFERTILITY A. O. Monakova, G.D. Sagaradze, N.A. Basalova, V.I. Kirpatovsky, D.A. Ohobotov, P.P. Nimiritsky, O.A. Grigorieva, V.S. Popov, A.A. Kamalov, A.Yu. Efimenko | 236 |
| 4. МОДЕЛЬ НЕЙТРОФИЛЬНОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У МЫШЕЙ, КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ Никольский А.А., Шиловский И.П., Ковчина В.И., Вишнякова Л.И., Барвинская Е.Д., Болотова С.И., Юмашев К.В., Хаитов М.Р..... | 237 |
| A MOUSE MODEL OF NEUTROPHILIC BRONCHIAL ASTHMA AS A TOOL FOR THE TESTING OF PERSONALIZED DRUGS Nikolskii A.A., Shilovskiy I.P., Kovchina V.I., Vishniakova L.I., Barvinskaia E.D., Bolotova S.I., Yumashev K.V., Khaitov M.R. | 238 |
| 5. ИНТРАЦЕРЕБРОВЕНТРИКУЛЯРНОЕ ВВЕДЕНИЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ КАК СПОСОБ ДОСТАВКИ ИНСТРУМЕНТОВ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ В МЫШИНЫЙ МОЗГ В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ GNAO1 ЭНЦЕФАЛОПАТИИ Поликарпова А.В., Васильева С.Г., Шмидт А.А., Старикова А.В., Бардина М.В..... | 239 |
| INTRACEREBROVENTRICULAR DELIVERY OF ADENO-ASSOCIATED VIRUSES INTO NEONATAL MOUSE BRAIN FOR GENE THERAPY PRECLINICAL STUDIES FOR GNAO1 ENCEPHALOPATHY Polikarpova A.V., Vassilieva S. G., Shmidt A.A., Starikova A.V., Bardina M.V..... | 240 |
| 6. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БИОМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА В ТЕРАПИИ АУТОИММУННОГО ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ У КРЫС Сигарева Л.П., Соловьев А.А., Кривенцов А.В., Александров В.Н. | 240 |
| EFFECTIVENESS OF USING THE BIOMEDICAL CELL PRODUCT IN THERAPY OF AUTOIMMUNE GLOMERULONEPHRITIS IN AN EXPERIMENTAL MODEL IN RATS Sigareva L.P., Soloviev A.A., Kriventsov A.V., Aleksandrov V.N..... | 241 |

| | |
|---|-----|
| 7. ВЫДЕЛЕНИЕ И ПРОТЕОМНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИЗОСОМАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ PMA-ИНДУЦИРОВАННЫХ МАКРОФАГОВ ЛИНИИ THP-1 ЧЕЛОВЕКА Строкач Н.Н., Богданов И.В., Финкина Е.И., Зиганшин Р.Х., Овчинникова Т.В. | 242 |
| ISOLATION AND PROTEOMIC CHARACTERISTICS OF LYSOSOMAL FRACTION OF PMA-INDUCED HUMAN THP-1 MACROPHAGES Strokach N.N., Bogdanov I.V., Finkina E.I., Ziganshin R.Kh., Ovchinnikova T.V. | 243 |

УДК: [577.161.2:616.43/45]:616-056.7, ББК: 28.704 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-232-234

ОЦЕНКА ФУНКЦИИ CFTR-КАНАЛА И ОТВЕТОВ НА МОДУЛЯТОРЫ У БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ ВАРИАНТОМ F508DEL

Н.В. Булатенко, А.С. Ефремова, Т.Б. Бухарова, Н.В. Петрова, Н.Ю. Каширская, Ю.Л. Мельяновская, Е.И. Кондратьева, Д.В. Гольдштейн

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Россия, 115478, Москва, Москворечье, 1, e-mail: bnv695@gmail.com, 89647250666

Муковисцидоз (МВ) является наиболее распространенным аутосомно-рецессивным заболеванием, сокращающим продолжительность жизни. К МВ приводят мутации в гене CFTR, который кодирует анионный канал, экспрессируемый в эпителиальных клетках. Наиболее распространенный генетический вариант – F508del, его аллельная частота в РФ 52,81% (2017). Данный вариант относится ко II классу, приводит к неправильному фолдингу белка CFTR и его преждевременной деградации. В настоящее время эффективность таргетной терапии может быть индивидуально оценена с помощью форсколинового теста на кишечных органоидах, получаемых от больных МВ с различными генотипами.

Ключевые слова: муковисцидоз (МВ), кишечные органоиды (КО), мутация, генетический вариант, генотип, форсколиновый тест (FIS), CFTR.

Цель: изучение функциональной активности канала CFTR и эффективности действия модуляторов у пациентов, в генотипе которых обнаружен генетический вариант F508del, при помощи форсколинового теста на КО.

Из биопатов толстого кишечника 4-х пациентов были выделены крипты. Их смешивали с Matrigel (Corning, США) и высевали на 24-луночные планшеты, культивирование проводили в многокомпонентной среде роста. Для анализа FIS кишечные органоиды высевали на 96-луночные планшеты, через 24 ч прижизненно окрашивали 0.84 мкМ Calcein AM и спустя час стимулировали форсколином (0.02 - 5 мкМ). Корректор VX-809 (5 мкМ) добавляли на стадии посева, а потенциатор VX-770 (5 мкМ) - одновременно с форсколином. Через определенные интервалы времени (0, 20, 40, 60 мин) проводили съемку «фиксированных» полей на флуоресцентном микроскопе Observer. D1 (Zeiss, Германия).

Исследования были проведены на КО, полученных от 4-х пациентов: два пациента – гомозиготы по варианту F508del, 3-й – с генотипом -с.1083G> A/F508del, в генотипе (F508del/-) 4-го пациента была обнаружена только одна мутация F508del. Для пациентов 1 и 2 было показано нарушение проводимости CFTR. Применение CFTR модуляторов (VX-770 и VX-809) восстанавливает функциональную активность канала. Полученные результаты соотносятся с литературными данными и доказывают, что при генотипе F508del/F508del небольшое количество не функционального белка CFTR все же присутствует на мембране, а модуляторы – потенциаторы (VX-770) могут быть использованы для терапии больных с таким генотипом наряду с корректорами (VX-809). Для 3 пациента (с.1083G> A/F508del) было показано, что функция канала CFTR полностью утрачена, поскольку отсутствует ответ на форсколин в высокой концентрации. Этот эффект был предсказуем, поскольку генотип сочетает «тяжелые» мутации I и II классов. Эффекты CFTR-модуляторов не существенны, поэтому терапия имеющимися препаратами не может быть рекомендована. Представленные результаты являются уникальными, поскольку генетический вариант с.1083G> A редкий, не описан в международных базах данных и на модели КО ранее не был исследован. Для пациента 4 (F508del/-), в отличие от кишечных органоидов пациентов 1-3, форсколин стимулирует значительное набухание органоидов, аналогичная картина наблюдается и в присутствии модуляторов. Эти результаты доказывают наличие функционального канала CFTR. Видимо пациент является только носителем этой распространенной мутации, что важно учитывать при планировании семьи.

Форсколиновый тест на КО является высокочувствительным персонализированным методом оценки функциональной активности канала CFTR и эффективности таргетных препаратов. Получаемые результаты имеют прикладное значение: позволяют описывать редкие варианты нуклеотидной последовательности гена CFTR и помогают персонализированно подобрать для их носителей таргетную терапию. В ходе исследований было показано, что генотип F508del/F508del поддается эффективной коррекции модуляторами (VX-770 и VX-809), для генотипа c.1083G> A/F508del действие модуляторов оказалось несущественным. А для пациента с генотипом F508del/– терапия таргетными препаратами не требуется.

Финансирование: Работа выполнена за средства Госзадания для ФГБНУ "МГНЦ".

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-232-234

EVALUATION OF CFTR CHANNEL FUNCTION AND RESPONSES TO MODULATORS FOR CYSTIC FIBROSIS PATIENTS WITH GENETIC VARIANT F508DEL

N.Bulatenko, A.Efremova, T.Bukharova, N.Petrova, N.Kashirskaya, Y.Melyanovskaya, E.Kondratyeva, D.Goldstein

Research Centre of Medical Genetics, Russia, 115478, Moscow, Moskvorechye, 1

Cystic fibrosis (CF) is the most common life-threatening autosomal recessive disease. CF is caused by mutations in the CFTR gene that encodes an anionic channel, which is expressed in epithelial cells. The most common genetic variant is F508del, its allelic frequency in the Russian Federation 52.81% (2017). This variant belongs to class II, leads to incorrect folding of the CFTR protein and its premature degradation. Currently, the effectiveness of target therapy can be individually evaluated by forskolin-induced swelling (FIS) assay on intestinal organoids obtained from CF patients with different genotypes.

Key words: cystic fibrosis (CF), intestinal organoids (IO), mutation, genetic variant, genotype, forskolin-induced swelling (FIS), CFTR.

The aim: studying the functional activity of CFTR channel and modulators efficiency in patients, who are carriers of F508del mutation using the FIS assay.

Crypts were isolated from biopsies of patients colons. They were mixed with Matrigel (Corning, USA), plated on 24-well plates and then they were cultivated in multicomponent growth medium. For FIS analysis, intestinal organoids were seeded on 96-well plates, after 24 hours they were stained by 0.84 μ M Calcein AM, and one hour later they were stimulated by forskolin (0.02 - 5 μ M). A VX-809 corrector (5 μ M) was added during the seeding step and a VX-770 potentiator (5 μ M) was added simultaneously with forskolin. After a certain time (0, 20, 40, 60 min), "fixed" fields were taken on Observer D1 fluorescent microscope (Zeiss, Germany).

Studies were carried out for 4 patients: 1 and 2 were homozygous for F508del mutation, 3 was compound heterozygote for F508del and c.1083G > A mutations, 4 had F508del on one of alleles of CFTR gene, the second mutation was not detected. The effect of the modulators was evaluated at different concentrations of forskolin.

For patients 1 and 2 violation of CFTR conductivity was shown. But by using CFTR modulators (VX-770 and VX-809) functional activity of the channel was restored. These results corresponds to the data that was previously reported and prove that there is a small amount of dysfunctional CFTR proteins on the cell membrane in patients with F508del/F508del genotype. Modulators can be used for therapy of patients with such genotype.

For patient 3 (c.1083G >A/F508del) CFTR channel function has been shown to be completely lost because there was no response to high concentrations of forskolin. This effect was predictable due to combination of the class I and II "heavy" mutations in the genotype. The effects of CFTR modulators were not significant, so therapy with available CFTR modulators cannot be recommended. These results are unique because the c.1083G >A mutation is rare and it was not previously investigated on the IO model.

In patient 4(F508del/–) unlike the IO of patients 1-3, in this case forskolin stimulates significant swelling of organoids, a similar pattern was observed in the presence of modulators. These results prove the presence of a functional CFTR channel. Apparently, the patient is only the carrier of this common mutation. This observation is important to take into account in family planning.

FIS assay on intestinal organoids is a highly sensitive personalized method for evaluating the functional activity of the CFTR channel and the effectiveness of CFTR modulators. The obtained results have great practical importance: they allow describe rare mutations and also serve as a basis for prescribing target therapy to diagnosed CF patients. Studies have shown that functions of F508del/F508del CFTR protein may be effectively corrected by

modulators, but for c.1083G>A/F508del CFTR protein effect of modulators is insignificant. And for a patient with F508del/– CFTR protein targeted therapy is not required.

Grant: This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education within the State assignment for the Research Center for Medical Genetics.

УДК 576.32/.36 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-234-235

ИНГИБИТОР ASIC1A МАМБАЛГИН-2 ТОРМОЗИТ РОСТ КЛЕТОК ЛЕЙКЕМИИ, ВЫЗЫВАЯ АРЕСТ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

М. Л. Бычков¹, М. А. Шулепко¹, В. Ю. Васильева², А. В. Сударикова², М. П. Кирпичников^{1,3}, Е. Н. Люкманова^{1*}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая д. 16/10

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр-т, д. 4

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

119992, Москва, Ленинские горы д. 1 стр. 12

* e-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

Впервые показано, что ингибитор протон-управляемых каналов ASIC1a может служить прототипом нового класса противолейкозных препаратов.

Ключевые слова: хроническая миелогенная лейкемия, лейкоз, протон-управляемые каналы, трехпетельные белки, клеточный цикл, Lu6/uPAR .

Применение ингибиторов тирозинкиназ позволило добиться существенного успеха в терапии хронической миелогенной лейкемии, однако поиск новых мишеней для терапии этого заболевания по-прежнему остается актуальной задачей. Известно, что в линии клеток K562 хронической миелогенной лейкемии человека экспрессируются протон-управляемые каналы ASIC1, которые являются молекулярной мишенью трехпетельных токсинов из яда черной мамбы (*Dendroaspis polylepis*) – мамбалгинов. Мамбалгины эффективно ингибируют гомо- и гетеромерные рецепторы, содержащие субъединицу ASIC1a, однако возможность их использования в качестве противоопухолевых агентов ранее не исследовалась. С помощью метода патч-кламп нами впервые обнаружена активация протон-управляемых каналов ASIC1a в клетках K562 в ответ на снижение внеклеточного pH. Показано, что рекомбинантный мамбалгин-2 ингибирует активность ASIC1 и тормозит пролиферацию клеток K562 с полумаксимальной эффективной концентрацией $EC_{50} \sim 0.2$ мкМ. Максимальный ингибирующий эффект мамбалгина-2 достигается после 72-часовой инкубации с клетками и при достижении pH клеточной среды ~ 6.6 . В клетках K562 мамбалгин-2 вызывает арест клеточного цикла в фазе G1 и снижает фосфорилирование регуляторов фазы G1 клеточного цикла – циклина D1 и циклинзависимой киназы CDK4, не влияя на активацию киназы CDK6. Полученные результаты свидетельствуют о возможности создания на основе мамбалгина-2 новых противолейкозных препаратов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 18-34-00497, М.Л.Б., исследование антипролиферативной активности мамбалгина-2 и № 19-015-00211, А.В.С., изучение токов в клетках K562), Президиума РАН (программа «Молекулярная и клеточная биология») и Президента РФ (стипендия № СП-4316.2018.4).

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-234-235

ASIC1A INHIBITOR MAMBALGIN-2 SUPPRESSES GROWTH OF LEUKEMIA CELLS BY CELL CYCLE ARREST

M.L. Bychkov¹, M.A. Shulepko¹, V.Y. Vasileva², A.V. Sudarikova², M.P. Kirpichnikov^{1,3}, E.N. Lyukmanova^{1*}

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia 117997, Moscow, 16/10 Mikluho-Maklaya

² Institute of Cytology RAS, St-Petersburg, Russia 194064, St-Petersburg, 4 Tikhoretsky ave

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia 119992, Moscow, 1 build 12 Leninskie Gory

* e-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

For the first time the inhibitor of proton-gated channel ASIC1a was proposed as prototype of new anti-leukemic compound

Key words: Chronic myelogenous leukemia, acid-sensing ion channels, three-finger proteins, cell cycle, Ly6/uPAR.

Although tyrosine kinase inhibitors brought significant success in the treatment of chronic myelogenous leukemia, the search of new molecular targets for the treatment of this disease remains actual. Earlier, expression of acid-sensing ion channels ASIC1a was shown in chronic myelogenous leukemia K562 cells. Three-finger toxins from the black mamba venom (*Dendroaspis polylepis*) – mambalgins – effectively inhibit homo- and heteromeric channels containing the ASIC1a subunit, however, their potential use as antitumor agents has not been previously elucidated. In this work, using the patch-clamp method, activation of ASIC1a channels in leukemia K562 cells was for the first time detected in response to a decrease of extracellular pH. Recombinant mambalgin-2 was shown to inhibit ASIC1a activity and suppress the proliferation of K562 cells with a half-maximum effective concentration (EC_{50}) ~ 0.2 μ M. The maximum inhibitory effect of mambalgin-2 is achieved after 72-hour incubation with cells and when the pH of the cell medium reaches ~ 6.6. In K562 cells, mambalgin-2 causes arrest of the cell cycle in the G1 phase and reduces the phosphorylation of G1 cell cycle phase regulators: cyclin D1 and cyclin-dependent kinase CDK4, without affecting the activity of CDK6 kinase. Thus, recombinant mambalgin-2 can be considered as a prototype of a new type of targeted drugs for the treatment of chronic myelogenous leukemia.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grants No. 18-34-00497, M.L.B.,

studying the antiproliferative activity of mambalgin-2 and No. 19-015-00211, A.V.S., studying ion currents in K562 cells), the Program “Molecular and Cellular Biology” of RAS and the Council for Grants of the President of the Russian Federation (scholarship No. SP-4316.2018.4).

УДК 602.9:116-003.93 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-235-237

ПЕРСПЕКТИВА ПРИМЕНЕНИЯ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЛИ ИХ СЕКРЕТОМА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ

А.О. Монакова¹, Г.Д. Сагарадзе², Н.А. Басалова^{1,2}, В.И. Кирпатовский^{2,3}, Д.А. Охоботов^{1,2}, П.П. Нимирицкий², О.А. Григорьева², В.С. Попов¹, А.А. Камалов^{1,2}, А.Ю. Ефименко^{1,2}

¹ Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия 119991, Москва, Ломоносовский проспект, 27/1

² Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия 119192, Москва, Ломоносовский проспект, 27/10

³ НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, Россия 105425, Москва, ул. Парковая 3-я, 51, стр. 1

e-mail: monakova-anya@mail.ru

В результате исследования выявлены регенеративные эффекты МСК и секретомы МСК на модели абдоминального крипторхизма у крыс.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, секретом, регенерация, бесплодие.

Мужское бесплодие становится актуальной медицинской проблемой, так как в бесплодных парах вклад мужского фактора достигает пятидесяти и более процентов. Мужское бесплодие трудно поддается лечению, так как почти половина случаев являются идиопатическими и требуют эмпирического подбора терапии или типа хирургического вмешательства, при этом часто использование выбранных методов лечения малоэффективно и сопряжено с риском развития серьезных осложнений. Таким образом, актуальной задачей является поиск эффективных и безопасных способов восстановления мужской фертильности. Ввиду возможной комплексной природы идиопатического мужского бесплодия, воздействие на несколько мишеней одновременно может быть целесообразным. Среди мультитаргетных биологических препаратов и биомедицинских клеточных продуктов, используемых для восстановления поврежденных тканей, одним из наиболее перспективных являются мезенхимные стромальные клетки (МСК). На различных моделях повреждения доказана ключевая роль МСК в поддержании жизнеспособности и функции стволовых клеток и их микроокружения, преимущественно за счет секреции паракринных факторов. В связи с этим может быть перспективным терапевтическое применение совокупности паракринных факторов, секретомы МСК, поскольку бесклеточный продукт лишен рисков эктопической трансплантации, его легче хранить и стандартизовать. Для оценки возможности применения МСК или их секретомы для восстановления фертильности была использована модель абдоминального крипторхизма у крыс. Было показано, что введение МСК или секретомы МСК под белочную оболочку яичка приводит к увеличению секреторной активности и сдерживанию пролиферации клеток Лейдига, а также к увеличению количества клеток Сертоли. При локальном введении МСК или секретомы МСК наряду со сперматогенезом происходило восстановление фертильности крыс-самцов, что проявлялось увеличением количества потомства у экспериментальных животных. Полученные результаты свидетельствуют о потенциальной возможности применения секретомы МСК для восстановления мужской фертильности.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект №19-75-30007, исследование роли секретомы МСК *in vivo*) и в рамках государственного задания МГУ имени М.В.Ломоносова с использованием оборудования, закупленного по Программе развития МГУ (выделение МСК и получение секретомы МСК).

UDC 602.9:116-003.93 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-235-237

A PERSPECTIVE ON APPLICATION OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS OR THEIR SECRETOME-BASED PRODUCTS FOR TREATING MALE INFERTILITY

A. O. Monakova¹, G.D. Sagaradze², N.A. Basalova^{1,2}, V.I. Kirpatovsky^{2,3}, D.A. Ohobotov^{1,2}, P.P. Nimiritsky², O.A. Grigorieva², V.S. Popov¹, A.A. Kamalov^{1,2}, A.Yu. Efimenko^{1,2}

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Basic Medicine
119991, Moscow, Lomonosovskiy av., 27/1

² Medical Research and Educational Centre, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119192, Moscow, Lomonosovskiy av., 27/10

³ N. Lopatkin Scientific Research Institute of Urology and Interventional Radiology - branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of Russian Federation

105425, Moscow, 3-d Parkovaya 51/1

e-mail: monakova-anya@mail.ru

The study revealed the regenerative effects of MSC and MSC secretome in a model of abdominal cryptorchidism in rats.

Key words: mesenchymal stem cells, secretome, regeneration, infertility.

Male infertility is becoming an urgent medical challenge since in infertile couples, the contribution of the male factor reaches half or more cases. Male infertility is difficult to treat, since almost half of the cases are idiopathic and require empirical selection of therapy or type of surgery, while often the use of the selected methods of treatment is ineffective and can lead to serious complications. Thus, an urgent task is to find effective and safe ways to restore male fertility. Due to the supposedly complex nature of idiopathic male infertility, simultaneous pharmacological action on multiple targets may be appropriate. Among multi-targeted biological products and biomedical cell products used to repair damaged tissues, mesenchymal stromal cells (MSC) are one of the most promising. The key role of MSC is maintaining the viability and function of stem cells and their microenvironments, mainly due to the secretion of paracrine factors, that has been proven in various models of tissue damage. In this

regard, the therapeutic use of a composition of paracrine factors, the MSC secretome, may be promising, since the cell-free product is devoid of the risks of ectopic transplantation, and it is easier to store and standardize it. In this study, a model of abdominal cryptorchidism in rats was used to evaluate the possibility of using MSC or their secretome to restore fertility. It has been shown that the local subcutaneous injection of MSC or MSC secretome leads to an increase in secretory activity and inhibition of Leydig cell proliferation, as well as an increase in the number of Sertoli cells. With local administration of MSC or MSC secretome, along with spermatogenesis, the fertility of male rats was restored, which was manifested by an increase in the number of offspring in experimental animals. The results obtained indicate that the use of the MSC secretome for restoring male fertility might be promising.

The study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 19-75-30007, in vivo experiments) and using equipment purchased as a part of Moscow State University Program of Development (MSC isolation and MSC secretome manufacturing).

УДК 612.017.1 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-237-238

МОДЕЛЬ НЕЙТРОФИЛЬНОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У МЫШЕЙ, КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Никольский А.А., Шиловский И.П., Ковчина В.И., Вишнякова Л.И., Барвинская Е.Д., Болотова С.И., Юмашев К.В., Хаитов М.Р.

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Государственный научный центр "Институт иммунологии" Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия
115522, Москва, Каширское ш., дом 24
e-mail: aa.nikolskii@nrcii.ru

Была создана экспериментальная мышинная модель бронхиальной астмы (БА) с преимущественной инфильтрацией лёгких нейтрофилами. Созданная модель может быть использована для изучения эффективности новых лекарственных средств для терапии нейтрофильной БА.

Ключевые слова: бронхиальная астма, мышинная модель, нейтрофилы.

Бронхиальная астма представляет собой гетерогенное, комплексное, хроническое воспалительное и обструктивное заболевание лёгких [1]. При данной патологии происходит инфильтрация лёгких провоспалительными клетками эозинофилами, либо нейтрофилами, хотя чаще всего у больных БА наблюдается смешанная эозинофильная/нейтрофильная инфильтрация [2]. Пациенты с нейтрофильной БА, доля которых может достигать 10-20% от всех случаев БА, резистентны к лечению кортикостероидами, поэтому актуальна задача создания новых персонализированных лекарственных препаратов для лечения данной патологии [3]. Целью данного исследования было создание модели БА у мышей с нейтрофильным воспалением.

Исследования проводили на мышах-самках BALB/c весом 18-20 г, возрастом 6-8 недель. Для моделирования нейтрофильной БА мышей иммунизировали 20 мкг аллергена овальбумина (OVA) в смеси со 100 мкл адьюванта Фрейнда на 0, 14 и 28 день. Затем, в течении 3 суток (в дни 45-47) группе №1 ингаляционно (в течение 20 мин) вводили смесь OVA концентрацией 1 мг/мл и липополисахарида (LPS), полученного из *E.coli*, концентрацией 1 мг/мл. Мыши группы №2 подвергались более длительному (5 суток) аэрозольному челленджу аналогичной дозой. Группа №3 состояла из интактных животных. После ингаляций измерялись уровни IgE, IgG1, IgG2a антител методом ИФА. Гиперреактивность бронхов (ГРБ) измерялась с помощью неинвазивной плетизмографии. Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) был собран для подсчета клеток методом световой микроскопии.

У обеих экспериментальных групп (№1 и 2) в сыворотке крови выявлялись аллерген-специфические антитела классов IgE, IgG1 и IgG2a, а также зарегистрировано повышение ГРБ на 20% по сравнению с интактными животными. Анализ клеточного состава БАЛ показал выраженную инфильтрацию лёгких нейтрофилами в группах 1 и 2 ($108\ 000 \pm 53\ 000$ и $193\ 000 \pm 66\ 000$ кл/мл, соответственно), что составляло 40% и 60% от общего количества клеток в БАЛ. Указанные данные свидетельствуют о более существенной инфильтрации нейтрофилами лёгких мышей, получавших 5 ингаляций по сравнению с тремя ингаляциями смесью OVA и LPS. В 3 группе нейтрофилы практически не детектировались (менее 0,3% от общего количества клеток БАЛ). Гистологический анализ тканей лёгких подтвердил эти данные.

Таким образом, иммунизация мышей модельным аллергеном в комплексе с адъювантом Фрейнда и с последующим аэрозольным введением того же аллергена в смеси с LPS приводит к развитию признаков нейтрофильной БА. Созданная модель может быть использована для тестирования новых персонализированных лекарственных средств, предназначенных для терапии нейтрофильной БА. Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ № МД-1578.2019.4.

Литература

1. *Global strategy for asthma management and prevention* © 2014 // *Global Initiative for Asthma*. 2019. P. 201.
2. Wenzel S.E. *Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches* // *Nat Med*. 2012. Vol. 18. P. 716–725.
3. Shilovskiy I.P., Eroshkina D.V., Babakhin A.A., Khaitov M.R. *Anti-cytokine therapy of bronchial asthma* // *Molecular Biology*. 2017. V. 51. No 1. P. 1825-1848.

UDC 612.017.1 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-237-238

A MOUSE MODEL OF NEUTROPHILIC BRONCHIAL ASTHMA AS A TOOL FOR THE TESTING OF PERSONALIZED DRUGS

Nikolskii A.A., Shilovskiy I.P., Kovchina V.I., Vishniakova L.I., Barvinskaia E.D., Bolotova S.I., Yumashev K.V., Khaitov M.R.

National Research Center – Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia
115522, Moscow, Kashirskoye shosse, 24
e-mail: aa.nikolskii@nrcii.ru

It was developed an experimental mouse model of bronchial asthma (BA) with the predominant infiltration of neutrophils into the lungs. The model developed can be used to test the efficacy of a novel personalized drugs for the therapy of neutrophilic asthma.

Key words: bronchial asthma, mouse model, neutrophils.

Bronchial asthma (BA) is a heterogeneous, complex, chronic inflammatory and obstructive pulmonary disease [1]. During asthma development, the proinflammatory cells - eosinophils or neutrophils, infiltrate into the lung tissue; however mixed eosinophilic/neutrophilic infiltration is common for the majority of BA patients [2]. Incidence of neutrophilic asthma estimated about 10 – 20% of total BA cases. Patients with this pathology are usually resistant to corticosteroid treatment. Therefore, the important task is development of new personalized drugs for the treatment of this pathology [3]. The purpose of this study was to set up a mouse model of BA with pulmonary neutrophilic inflammation.

The experiments were performed using female BALB/c mice weighing 18-20 g, aged 6-8 weeks. In order to model neutrophilic BA, mice were immunized with 20 µg of ovalbumin allergen (OVA) in a mixture with 100 µl of Freund's adjuvant on days 0, 14 and 28. Then, on days 45-47, group №1 was inhaled (for 20 minutes) with the mixture of OVA at a concentration of 1 mg/ml and lipopolysaccharide (LPS) from *E.coli* at a concentration of 1 mg/l. Mice of group №2 were subjected to a longer (5 days) aerosol challenge with a similar dose. Group 3 consisted of intact animals. After inhalation the sera levels of IgE, IgG1, IgG2a antibodies were measured by ELISA. Bronchial hyperresponsiveness (BHR) was measured by non-invasive plethysmography. Bronchoalveolar lavage (BAL) was collected for cell counting by light microscopy.

The experimental groups had a 20% higher level of BHR, and they had higher antibody levels compared to intact mice. Analysis of BAL cell composition revealed a pronounced neutrophilic infiltration of the lungs in mice from groups 1 and 2 (108 000±53 000 and 193 000±66 000 cells/ml, respectively) that corresponds to 40% and 60% of total cells. There were no neutrophils in BAL samples of group 3 observed (less than 0.3% of total cells). Histological analysis of lung tissues confirmed these data.

Immunization of mice with an allergen together with Freund's adjuvant following the aerosol administration of the same allergen mixed with LPS leads to the development of experimental features of neutrophilic BA. The developed model can be used for the testing of novel personalized drugs for the future cure of the pathology. This study was supported by a grant of the President of the Russian Federation № MD-1578.2019.4.

References

1. *Global strategy for asthma management and prevention* © 2014 // *Global Initiative for Asthma*. 2019. P. 201.
2. Wenzel S.E. *Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches* // *Nat Med*. 2012. Vol. 18. P. 716–725.
3. Shilovskiy I.P., Eroshkina D.V., Babakhin A.A., Khaitov M.R. *Anti-cytokine therapy of bronchial asthma* // *Molecular Biology*. 2017. V. 51. No 1. P. 1825-1848.

УДК 612.084 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-239-240

ИНТРАЦЕРЕБРОВЕНТРИКУЛЯРНОЕ ВВЕДЕНИЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ КАК СПОСОБ ДОСТАВКИ ИНСТРУМЕНТОВ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ В МЫШИНЫЙ МОЗГ В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ GNAO1 ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Поликarpова А.В.^{1,2}, Васильева С.Г.^{1,2}, Шмидт А.А.^{1,2}, Старикова А.В., Бардина М.В.^{1,2,3}

¹ Институт биологии гена, Российской академии наук, 119334, Москва, Россия

² ООО "Марлин Биотех", 143026, Москва, Россия

³ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, 119334, Москва, Россия
e-mail: a.polikarpova.marlin@gmail.com

В целях предварительного тестирования препаратов генной терапии на основе аденоассоциированных вирусов, разработанных для лечения GNAO1 энцефалопатии, были апробированы способы введения контрольных препаратов в мозг новорожденных мышей. Показано, что через 4 недели после интрацеребровентрикулярного (внутрижелудочкового) введения препарата экспрессия репортерного гена наблюдается в GNAO1-богатых областях мозга. Следовательно, данный способ введения можно использовать для изучения эффективности разрабатываемых препаратов генной терапии на мышах.

Ключевые слова: болезни мозга, генная терапия, аденоассоциированные вирусы, доклинические исследования, доставка трансгена, GNAO1 энцефалопатия

Генная терапия является перспективным подходом для лечения тяжелых наследственных заболеваний мозга. Для доставки терапевтических конструкций в ткани мозга наибольший интерес представляют аденоассоциированные вирусы (ААВ) ввиду того, что они не вызывают заболеваний у человека и животных и обладают тропизмом к большинству клеток и тканей, включая нейрональную. Нашей группой в настоящее время разрабатывается генная терапия на основе ААВ для лечения тяжелого наследственного заболевания - GNAO1 энцефалопатии, которая проявляется в виде эпилептических припадков и неконтролируемых движений у новорожденных детей. Для тестирования эффективности и безопасности препарата первоначальной задачей является выбор способа введения, обеспечивающего доставку и экспрессию трансгена в GNAO1-богатых областях мозга (базальные ганглии, обонятельные луковицы, в меньшей степени кора головного мозга). С этой целью в настоящей работе на новорожденных мышатах был опробован интрацеребровентрикулярный способ введения препарата ААВ, несущего репортерный ген. Путем тройной трансфекции клеток НЕК293 были получены препараты, содержащие репортерный ген eGFP под промотором CMV, упакованные в ААВ серотипов 6, 9 или DJ. После очистки в градиенте йодиксанола, вирусные частицы концентрировали в буфере DPBS для получения титра не менее $1E13$ векторных геномов (вг) на мл, определенного с помощью ITR-специфической кПЦР. Для инъекций в вирусную суспензию был добавлен 0,05% трипановый синий для контроля места доставки. Новорожденным мышатам CD-1 вводили препарат посредством двусторонней интрацеребровентрикулярной инъекции в дозе $5E10$ вг на животное. Через 4 недели после введения оценивали экспрессию репортерного гена с помощью микроскопа Evos M7000. Анализ фронтальных срезов мозга показал, что через 4 недели после введения наблюдается экспрессия eGFP в тканях мозга, включая мозолистое тело, кору головного мозга и базальные ганглии, богатые GNAO1. Таким образом, интрацеребровентрикулярные инъекции являются подходящим способом введения при GNAO1 энцефалопатии для оценки эффективности генотерапевтических препаратов на основе ААВ на животных моделях.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-239-240

INTRACEREBROVENTRICULAR DELIVERY OF ADENO-ASSOCIATED VIRUSES INTO NEONATAL MOUSE BRAIN FOR GENE THERAPY PRECLINICAL STUDIES FOR GNAO1 ENCEPHALOPATHY

Polikarpova A.V.^{1,2}, Vassilieva S. G.^{1,2}, Shmidt A.A.^{1,2}, Starikova A.V.^{1,2}, Bardina M.V.^{1,2,3}

¹ Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334, Moscow, Russia

² Marlin Biotech LLC, 143026, Moscow, Russia

³ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334, Moscow, Russia
e-mail: a.polikarpova.marlin@gmail.com

In the present work we validated neonatal intracerebroventricular injections for AAV-mediated transgene delivery into GNAO1-rich regions of the murine brain. This administration route can be used for testing efficacy of AAV-based gene therapy for GNAO1 encephalopathy in the mouse models.

Key words: genetic brain disorders, gene therapy, adeno-associated viruses, preclinical studies, neonatal intracerebroventricular injection, GNAO1 encephalopathy

Gene therapy is a promising approach for treating severe genetic brain disorders. For delivery of therapeutic constructs, popular vectors of choice are the recombinant adeno-associated viruses (rAAVs) due to their non-pathogenic nature and neuronal tissue tropism. Our group is currently developing AAV-based gene therapy for treatment of GNAO1 encephalopathy characterized by early onset epilepsy and movement disorder. In the present study, we aimed at determining AAV administration route to efficiently target affected GNAO1-positive brain regions in mice models. GNAO1-specific immunofluorescence staining of coronal mice brain sections identified striatum, olfactory bulbs and to lesser extent cerebral cortex as the most abundant areas in GNAO1 expression. Considering these results, the intracerebroventricular (ICV) route of delivery was selected for our experiments due to its proximity to basal ganglia. Via triple transfection of HEK293 cells, we produced rAAV vectors containing eGFP reporter gene driven by CMV promoter and packaged into serotypes 6, 9 or DJ. Iodixanol purified vectors were concentrated in the DPBS buffer to obtain titer not less than 1E13 vector genomes (vg) per mL as determined by ITR-specific qPCR. For injections virus suspension was supplemented with 0,05% trypan blue to control delivery site. Neonatal CD-1 mice received AAV-eGFP via bilateral ICV injection at a dose of 5E10 vg per animal. 4 weeks post-injection brains were removed, reporter gene expression was briefly screened with an UV transilluminator and AAV/DJ-eGFP infected brains were chosen for further analysis. Coronal sections of DJ-transduced brains were scanned using Microscope Evos M7000. We report broad distribution of eGFP expression across brain tissues including corpus collosum, cerebral cortex and most importantly GNAO1-rich striatum. Therefore, we validate ICV injections as a reasonable administration route for testing efficacy of AAV-based gene therapies for GNAO1 encephalopathy in murine preclinical models.

УДК 612.084:612.062 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-240-242

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БИМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА В ТЕРАПИИ АУТОИММУННОГО ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ У КРЫС

Сигарева Л.П., Соловьев А.А., Кривенцов А.В., Александров В.Н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
194100, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2
e-mail: sigaryowa@yandex.ru

Воспроизвели аутоиммунный гломерулонефрит у крыс и его терапию аллогенными мезенхимальными мультипотентными стромальными клетками (ММСК). Показали значимое улучшение биохимических показателей мочи и скорости клубочковой фильтрации, сопряженное с трансплантацией ММСК.

Ключевые слова: аутоиммунный гломерулонефрит; мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки; биомедицинский клеточный продукт.

Введение. Гломерулонефрит (ГН) – аутоиммунное хроническое заболевание почек, изначально возникающее в виде воспалительных процессов в почечных клубочках и затем распространяющееся на остальные почечные структуры. Длительный латентный период, широкая распространённость среди всех групп населения, тяжесть последствий и неэффективность стандартных методов лечения инициируют потребность в разработке терапии с использованием клеточных технологий [1].

Материалы и методы. В качестве реципиентов донорского материала (1 мл 20% суспензии ткани коркового вещества материнской особи на полном адьюванте Фрейнда (BD, США) в соотношении 1:1) использовали 4-месячных самок крыс линии Wistar (n=5). Материал вводили в пять точек: внутрибрюшинно, в мышцы подмышечных областей и верхней 1/3 бедра на 1, 3, 5 и 21 сутки [2]. На 22 сут проводили однократную системную трансплантацию ММСК четвёртого пассажа в количестве 1000 клеток/г массы животного. В качестве источника ММСК использовали костный мозг самки крысы четырёхмесячного возраста. В ходе эксперимента оценивали изменение массы тела, биохимических показателей крови и мочи, объёмов потреблённой жидкости в сутки и суточной мочи [3].

Результаты. Установлено, что в динамике развития экспериментального ГН можно выделить три периода: латентный период продолжительностью примерно 10 дней, период манифестации, развивающийся спустя 10 дней от начала эксперимента, и период выздоровления, сопряженный с клеточной терапией и значимыми признаками восстановления функции почек к 52 суткам эксперимента. Период манифестации проявлялся протеинурией ($0,370 \pm 0,04$ г/л), микрогематурией, уменьшением концентрации креатинина ($2,93 \pm 0,55$ ммоль/л) и мочевины ($290,6 \pm 240,1$ ммоль/л) в моче, снижением скорости клубочковой фильтрации ($0,372 \pm 0,096$ мл/мин). В период выздоровления наблюдали снижение концентрации белка ($0,247 \pm 0,013$ г/л), увеличение концентрации мочевины ($971,8 \pm 133,2$ ммоль/л) и креатинина ($9,139 \pm 0,323$ ммоль/л) в моче, увеличение скорости клубочковой фильтрации ($1,983 \pm 0,367$ мл/мин).

Закключение. Модель ГН у крыс, представленная в работе, несет характерные для ГН нарушения в виде мочевого синдрома и снижения скорости клубочковой фильтрации. Она может быть использована для исследования эффективности клеточной терапии аутоиммунного гломерулонефрита. Показано, что трансплантация ММСК приводит к улучшению биохимических показателей мочи, увеличению скорости клубочковой фильтрации, отражая, очевидно, известные паракринные эффекты ММСК: противовоспалительный и иммуномодулирующий. Полученные данные указывают на возможность и целесообразность разработки биомедицинского клеточного продукта на основе культивируемых ММСК.

Литература

1. William, G. Couser et al. *The etiology of glomerulonephritis: roles of infection and autoimmunity* // *Kidney International*. 2014. Vol. 86, №5. P. 905–914.
2. Пальцева, Е.М. Экспериментальные модели хронических заболеваний почек // *Клиническая нефрология*. – 2009. – № 2. – С. 37-42.
3. Caldas, H.C. et al. *Comparative effects of mesenchymal stem cell therapy in distinct stages of chronic renal failure* // *Clin. Exp. Nephrol.* 2015. Vol. 19, № 5. P. 783–789.

UDC 612.084:612.062 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-240-242

EFFECTIVENESS OF USING THE BIOMEDICAL CELL PRODUCT IN THERAPY OF AUTOIMMUNE GLOMERULONEPHRITIS IN AN EXPERIMENTAL MODEL IN RATS

Sigareva L.P., Soloviev A.A., Kriventsov A.V., Aleksandrov V.N.

Federal State budgetary Educational Institution of Higher Education St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia
194100, St. Petersburg, Litovskaya st. 2
e-mail: sigaryowa@yandex.ru

A rat's autoimmune glomerulonephritis and its therapy by allogenic mesenchymal multipotential stem cells (MMSCs) was reproduced. Significant increase of urinary biochemical indicators and glomerular filtration rates associated with transplantation of MMSCs was provided.

Key words: autoimmune glomerulonephritis; mesenchymal multipotential stem cells, biomedical cell product.

Introduction. Glomerulonephritis (GN) - an autoimmune chronic kidney disease that initially occurs as an inflammatory process in the renal glomeruli and then spreads to the remaining renal structures. A long latent period, widespread among all population groups, the severity of the consequences and the ineffectiveness of standard methods of treatment initiate the need for the development of therapy using cell technology [1].

Materials and methods. We used 4-month-old female Wistar rats (n = 5) as recipients of donor material (1 ml of a 20% suspension of maternal cortical tissue on Freund's complete adjuvant (BD, USA) in a 1: 1 ratio). The material was injected in five areas: intraperitoneally, into the axillary muscles and the upper 1-3 thighs on a 1st, 3rd, 5th and 21st day [2]. A single systemic transplantation of MMSCs of the fourth passage was performed in the amount of 1000 cells/g of animal weight on a day 22. The bone marrow of four months female rat was used as a MMSC source. Changes in body weight, biochemical parameters of blood and urine, the amount of fluid consumed per day and daily urine were evaluated [3].

Results. It was established that three periods can be distinguished in the dynamics of the development of experimental GN: a latent period (about 10 days), a period of manifestation that develops 10 days after the start of the experiment, and a recovery period associated with cell therapy and significant signs of kidney function restoration by 52 days of conduction experiment. The manifestation process is developed by proteinuria ($0,370 \pm 0,04$ g/l), microhematuria, decrease in creatinine concentration ($2,93 \pm 0,55$ mmol/l) and urea ($290,6 \pm 240,1$ mmol/l) in the urine, a decline glomerular need rate ($0,372 \pm 0,096$ ml/min). During the recovery period, a decrease in protein concentration ($0,247 \pm 0,013$ g/l), an increase in the urea concentration ($971,8 \pm 133,2$ mmol/l), in creatinine ($9,139 \pm 0,323$ mmol/l) of the urine, an increase in glomerular filtration rate were observed ($1,983 \pm 0,367$ ml/min).

Conclusion. The GN model in rats presented in the work carries violations typical of GN in the form of urinary syndrome and a decrease in glomerular filtration rate. It can be used to study the effectiveness of cell therapy for autoimmune glomerulonephritis. It was shown that MMSCs transplantation leads to an improvement in the biochemical parameters of urine, an increase in glomerular filtration rate, reflecting, obviously, the known paracrine effects of MMSCs: anti-inflammatory and immunomodulating. The data obtained indicate the possibility and feasibility of development a biomedical cell product based on cultured MMSCs.

References

1. William, G. Couser et al. *The etiology of glomerulonephritis: roles of infection and autoimmunity // Kidney International*. 2014. Vol. 86, №5. P. 905–914.
2. Paltseva, E.M. *Experimental models of chronic nephropathies // Clinical Nephrology*. 2009. №2. P. 37-42.
3. Caldas, H.C. et al. *Comparative effects of mesenchymal stem cell therapy in distinct stages of chronic renal failure// Clin. Exp. Nephrol*. 2015. Vol. 19, № 5. P. 783–789.

УДК 577.29; 576.311.344 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-242-244

ВЫДЕЛЕНИЕ И ПРОТЕОМНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИЗОСОМАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ РМА-ИНДУЦИРОВАННЫХ МАКРОФАГОВ ЛИНИИ ТНР-1 ЧЕЛОВЕКА

Строкач Н.Н., Богданов И.В., Финкина Е.И., Зиганшин Р.Х., Овчинникова Т.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия, 117997, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
e-mail: strokach-1999@mail.ru

Разработана методика выделения лизосомальной фракции РМА-индуцированных макрофагов линии ТНР-1 человека. С использованием метода LC-MS проведен анализ протеомного содержимого лизосом данных клеток.

Ключевые слова: эндолизосомальная деградация, лизосомы, макрофаги, антиген-презентирующие клетки, аллергия, процессинг аллергенов

Аллергия является серьезной проблемой нашего времени и по прогнозу ВОЗ в будущем может стать самым распространенным заболеванием в мире. Развитие аллергической реакции включает в себя целый каскад молекулярных и клеточных взаимодействий, ключевую роль в котором играют антиген-презентирующие клетки (АПК), в том числе макрофаги. Эти клетки осуществляют активный захват аллергенных молекул с помощью фагоцитоза, их деградацию и презентацию пептидных фрагментов Т-лимфоцитам. Исследование процессинга аллергенов является актуальной задачей, первым шагом на пути решения которой является изучение лизосомального содержимого АПК.

Известно, что различные типы АПК человека отличаются по своей способности к процессингу антигенов, что обусловлено различным уровнем экспрессии ферментов деградама лизосом, например, катепсинов. В качестве объекта исследования была выбрана линия проманоцитов человека THP-1. Суспензию клеток THP-1 растили в CO₂-инкубаторе в среде RPMI-1640 с добавлением β-меркаптоэтанола. Дифференцировку THP-1 в макрофаги индуцировали фобол-12-миристан-13-ацетатом (PMA). Клетки инкубировали в течение 3 суток, собирали и ресуспендировали в трис-ацетатном буфере, pH 7,0, содержащем сахарозу. Микросомальную фракцию осаждали серией последовательных центрифугирований, после чего избавлялись от митохондрий, инкубируя микросомы в присутствии хлорида кальция. Лизосомы осаждали последующим центрифугированием в градиенте перколла и растворяли в фосфатно-цитратном буфере, pH 5,0, содержащем 0,1% тритон X-100. Наличие характерных для лизосом кислых гликозидаз подтверждали, используя в качестве субстрата 4-нитрофенил N-ацетил-β-D-глюкозаминид. Белки, содержащиеся во фракции лизосом, после денатурации в присутствии дезоксихолата натрия, восстановления дисульфидных связей и карбамидометилирования SH-групп, подвергали триптическому гидролизу. Разделение и анализ триптических фрагментов проводили методом хромато-масс-спектрометрии (LC-MS). Первичные данные после LC-MS обрабатывали в программе MaxQuant и далее анализировали с помощью программы Perseus. Аннотирование и GO-анализ белков проводили, используя набор белков Homo sapiens в базе данных UniprotKB.

В результате в лизосомальной фракции PMA-индуцированных макрофагов линии THP-1 человека было идентифицировано 2493 белка, из которых 155 были аннотированы как лизосомальные белки. Среди них были выявлены основные протеолитические ферменты, участвующие в лизосомальной деградации антигенов: катепсины (A, B, C, D, H, L, S, Z), аминопептидаза N, карбоксипептидаза Q, трипептидил пептидаза 1, дипептидил пептидаза 2. Кроме протеаз, были обнаружены и другие белки лизосом, а именно кислые гидролазы – нуклеазы (ДНКаза II альфа, РНКаза T2) и гликозидазы (N-ацетилглюкозамин-6-сульфатаза, лизосомальная альфа-глюкозидаза, альфа-маннозидаза, бета-глюкуронидаза и др.), ГТФазы (Rab7 и Rab14), участвующие в везикулярном транспорте, и т.д.

Таким образом, в результате проведенной работы была разработана методика получения лизосомальной фракции PMA-индуцированных макрофагов линии THP-1 человека. С помощью протеомного анализа было показано, что данная фракция содержит основные ферменты процессинга антигенов и может быть в дальнейшем использована для изучения эндолизосомальной деградации аллергенов *in vitro*. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №20-45-05002).

UDC 577.29; 576.311.344 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-242-244

ISOLATION AND PROTEOMIC CHARACTERISTICS OF LYSOSOMAL FRACTION OF PMA-INDUCED HUMAN THP-1 MACROPHAGES

Strokach N.N., Bogdanov I.V., Finkina E.I., Ziganshin R.Kh., Ovchinnikova T.V.

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation, 117997, Miklukho-Maklaya str., 16/10
e-mail: strokach-1999@mail.ru*

A method for isolating the lysosomal fraction of PMA-induced human THP-1 macrophages has been developed. The proteomic content of the lysosomes of these cells was analyzed using the LC-MS method.

Key words: endolysosomal degradation, lysosomes, macrophages, antigen-presenting cells, allergy, allergen processing

Allergy is a serious problem of our time and, according to the WHO forecast, it may become the most common disease in the world in the future. The development of an allergic reaction includes a whole cascade of molecular and cellular interactions, in which antigen-presenting cells (APCs), including macrophages, play a key role. These cells actively capture allergenic molecules by phagocytosis, degrade them, and present peptide fragments to T-lymphocytes. The investigation of allergen processing is an extremely urgent task, and the studying of the lysosomal content of the APCs is the first step for the solution of this problem.

It is known that different types of human APCs differ in their ability to process antigens, which is due to different levels of expression of lysosomal degradation enzymes, for example, cathepsins. The human promonocyte line THP-1 was chosen as the object of the study. Suspension of THP-1 cells was grown in a CO₂ incubator in RPMI-1640 medium supplemented with β-mercaptoethanol. Differentiation of THP-1 into macrophages was induced by phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). The cells were incubated for 3 days, harvested and resuspended in Tris-acetate

buffer, pH 7.0, containing sucrose. The microsomal fraction was precipitated by a series of sequential centrifugations, after which mitochondria were removed by incubating microsomes in the presence of calcium chloride. Lysosomes were precipitated by subsequent centrifugation in a Percoll gradient and dissolved in phosphate-citrate buffer, pH 5.0, containing 0.1% Triton X-100. The presence of acid glycosidases characteristic of lysosomes was confirmed using 4-nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide as a substrate. The proteins contained in the lysosomal fraction, after denaturation in the presence of sodium deoxycholate, reduction of disulfide bonds, and carbamidomethylation of SH groups, were subjected to tryptic hydrolysis. Tryptic fragments were separated and analyzed by liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS). Primary data after LC-MS was processed in the MaxQuant program and then analyzed using the Perseus program. Protein annotation and GO analysis were performed using a set of Homo sapiens proteins in the UniprotKB database.

As a result, 2,493 proteins were identified in the lysosomal fraction of PMA-induced human THP-1 macrophages, of which 155 were annotated as lysosomal proteins. Among them, the main proteolytic enzymes involved in lysosomal antigen degradation were identified: cathepsins (A, B, C, D, H, L, S, Z), aminopeptidase N, carboxypeptidase Q, tripeptidyl peptidase 1, and didepeptidyl peptidase 2. In addition to proteases, other lysosomal proteins were found, namely acid hydrolases – nucleases (DNase II alpha, RNase T2) and glycosidases (N-acetylglucosamine-6-sulfatase, lysosomal alpha-glucosidase, alpha-mannosidase, beta-glucuronidase, etc.), GTPases (Rab7 and Rab14) involved in vesicular transport, etc.

Thus, as a result of this work, a method for obtaining the lysosomal fraction of PMA-induced human THP-1 macrophages was developed. Using proteomic analysis, it was shown that this fraction contains the main enzymes of antigen processing and can be further used to study endolysosomal degradation of allergens *in vitro*. The work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 20-45-05002).

ЗАДАЧИ БИОИНФОРМАТИКИ В ГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ И РАЗРАБОТКЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ, СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И ПРОМЫШЛЕННОСТИ

BIOINFORMATICS TASKS IN GENE RESEARCHING AND DEVELOPMENT OF GENE TECHNOLOGIES FOR HEALTH CARE, AGRICULTURE AND MANUFACTURING INDUSTRY

Руководители

А.А. Лагунин д.б.н., профессор РАН, зав. кафедрой биоинформатики РНИМУ имени Н.И. Пирогова, в.н.с. ИБМХ/ A.A. Lagunin doctor of science (Biology), professor of RAS, head of bioinformatics chair of RNRMU, leading research scientist IBMC

В.Ю.Макеев член-корреспондент РАН, д.ф.-м.н., зав. отделом ФБГНУ ИОГен РАН им. Н.И. Вавилова / V.Y. Makeev corresponding member of RAS, doctor of science (Physics and Mathematics) head of Division, N.I. Vavilov Institute of General Genetics of RAS

| | |
|--|-----|
| 1. ИНТЕГРАЦИЯ РОССИЙСКИХ МИКРОБНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ В ЕВРОПЕЙСКУЮ СИСТЕМУ HORIZON 2020 Василенко А.Н., Василенко М.А., Ступарь О.С., Кочкина Г.А., Озерская С.М..... | 246 |
| INTEGRATION OF RUSSIAN MICROBIAL GENETIC RESOURCES IN EUROPEAN SYSTEM HORIZON 2020 Vasilenko A.N., Vasilenko M.A., Stupar O.S., Kochkina G.A., Ozerskaya S.M. | 247 |
| 2. ПОИСК МЕТОДОМ НЕЙРОСЕТЕВОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ КОНДЕНСИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА С МУЛЬТИТАРГЕТНОЙ RAGE-ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ Васильев П.М., Жуковская О.Н., Спасов А.А., Морковник А.С., Кочетков А.Н..... | 248 |
| SEARCHING BY METHOD OF NEURAL NETWORK MODELING OF CONDENSED BENZIMIDAZOLE DERIVATIVES WITH MULTI-TARGET RAGE-INHIBITORY ACTIVITY Vassiliev P.M., Zhukovskaya O.N., Spasov A.A., Morkovnik A.S., Kochetkov A.N. | 249 |
| 3. ПРЕДСКАЗАНИЕ ПАТОГЕННОСТИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В БЕЛКАХ BRCA1 И BRCA2 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ MNA ДЕСКРИПТОРОВ И НАИВНОГО БАЙЕСОВСКОГО КЛАССИФИКАТОРА Задорожный А.Д., Филимонов Д.А., Лагунин А.А. | 250 |
| PREDICTION OF PATHOGENIC EFFECT FOR AMINO ACID SUBSTITUTIONS IN BRCA1 AND BRCA2 PROTEINS USING MNA DESCRIPTORS AND NAIVE BAYES CLASSIFIER Zadorozhny A.D., Filimonov D.A., Lagunin A.A. | 251 |
| 4. СОЗДАНИЕ БАЗЫ ДАННЫХ ПИЩЕВЫХ РАСТЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЯ С ПОЛЕЗНЫМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ Зайцев В.Г., Иващенко Р.Ю., Агапова Д.А., Желтова А.А. | 252 |
| DEVELOPMENT OF A DATABASE OF FOOD PLANTS CONTAINING HEALTH BENEFICIAL COMPOUNDS Zaitsev V.G., Ivashchenko R. Yu., Agapova D.A., Zheltova A.A. | 253 |
| 5. ПРОГНОЗ БЕЛОК-ЛИГАНДНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ IN SILICO Д.А.Карасев, Д.А.Филимонов, Б.Н.Соболев, А.А.Лагунин..... | 254 |
| IN SILICO PREDICTION OF PROTEIN-LIGAND INTERACTIONS D.Karasev, D.Filimonov, B.Sobolev, A.Lagunin | 255 |
| 6. МНОЖЕСТВЕННОЕ ВЫРАВНИВАНИЕ ПРОМОТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ИЗ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА Коротков Е.В..... | 256 |
| MULTIPLE ALIGNMENT OF PROMOTER SEQUENCES FROM HUMAN GENOM Korotkov E.V..... | 256 |
| 7. МОДЕЛИРОВАНИЕ АНТИГЛИКИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ Литвинов Р.А., Васильев П.М..... | 257 |
| ANTIGLYCATION ACTIVITY MODELING BY THE METHODS OF MACHINE LEARNING Litvinov R.A., Vasiliev P.M. | 258 |

| | |
|--|-----|
| 8. ПРЕДСКАЗАНИЕ ПОТЕРЬ ГЕНОВ НА ОСНОВЕ ГЕНОМНЫХ СТРУКТУР Рубанов Л.И., Шиловский Г.А., Селиверстов А.В., Зверков О.А., Любецкий В.А. | 258 |
| GENE LOSS PREDICTION BASED ON GENOMIC STRUCTURE Rubanov L.I., Shilovsky G.A., Seliverstov A.V., Zverkov O.A., Lyubetsky V.A. | 259 |
| 9. ЭВОЛЮЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМНЫХ СТРУКТУР У МЕТАЗОА: АЛГОРИТМ И ПРОГРАММА Горбунов К.Ю., Любецкий В.А. | 260 |
| EVOLUTION OF MITOCHONDRIAL GENOMIC STRUCTURES IN METAZOANS: ALGORITHM AND SOFTWARE Gorbunov K.Yu., Lyubetsky V.A. | 261 |
| 10. БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛАСТЕРОВ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА НЕРИБОСОМНЫХ ПЕПТИДОВ БАКТЕРИЙ НА ОСНОВЕ ПРЕДСКАЗАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ Клименко А.И., Лашин С.А., Афонников Д.А., Матушкин Ю.Г. | 262 |
| BIOINFORMATIC ANALYSIS OF BIOSYNTHETIC GENE CLUSTERS OF NONRIBOSOMAL PEPTIDES IN BACTERIA BASED ON PREDICTION OF GENE TRANSLATION ELONGATION EFFICIENCY A.I. Klimenko, S.A. Lashin, D.A. Afonnikov, Yu.G. Matushkin | 264 |
| 11. САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ MIRNA В MRNA КАНДИДАТНЫХ ГЕНОВ БИПОЛЯРНОГО РАССТРОЙСТВА ЧЕЛОВЕКА Пинский И.В. | 265 |
| MIRNA BINDING SITES IN MRNAS OF HUMAN BIPOLAR DISORDER GENE CANDIDATES Pinsky I. V. | 266 |
| 12. ПОИСК SINE ПОВТОРОВ В ГЕНОМЕ РИСА Суворова Ю.М., Каминская А.М., Коротков Е.В. | 267 |
| DETECTION OF NEW COPIES OF SINE IN THE RICE GENOME Suvorova Y.M., Kamionskaya A.M., Korotkov E.V. | 268 |

УДК 579.69 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-246-247

ИНТЕГРАЦИЯ РОССИЙСКИХ МИКРОБНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ В ЕВРОПЕЙСКУЮ СИСТЕМУ HORISON 2020

Василенко А.Н., Василенко М.А., Ступарь О.С., Кочкина Г.А., Озерская С.М.

Всероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН - обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН

Пушино, Россия

142290, Россия, Московская область, г. Пушино, проспект Науки, д.5

e-mail: vanvkm@gmail.com

Представлена схема организации интеграции информационных потоков о микробных генетических ресурсах, поддерживаемых в Европейских биологических ресурсных центрах (мБРЦ) с биологическими базами данных системы *Наук о жизни (Life Science)*.

Ключевые слова: генетические ресурсы, базы данных, Науки о Жизни, коллекции микроорганизмов

Данная проблема поставлена в связи с необходимостью определить, где можно найти и получить для работы ту или иную культуру микроорганизма, для которой проведены фундаментальные или прикладные исследования, с публикацией полученных данных в научных журналах или сохранением их в специализированных базах данных.

Для выполнения данной задачи сотрудники Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ, ИБФМ РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН) получили возможность участия в двух международных проектах системы HORISON 2020, а именно:

1. INFRAEOSC-04-2018. Research and Innovation Action (RIA) 2018-2022. Grant Agreement No.: 824087. Acronym: EOSC-Life. Full Title: «Providing an open collaborative space for digital biology in Europe».

2. INFRADEV-03-2019. Research and Innovation Action 2020-2023. Project N°.: 871129. Acronym: IS_MIRRI21. Full Title: «Implementation and Sustainability of Microbial Resource Research Infrastructure for 21st Century».

В докладе представлены работы ВКМ и других российских микробных коллекций в организации компьютерных связей и вычисления индексов использования микроорганизмов в биологических базах данных (*Life Science*) с описанием конкретных модулей и блоков данных. Финальный шаг процесса - «инвентаризация», где

проводится проверка, какие микроорганизмы представлены в европейском сообществе, в каких практических областях каждый из них используется и как, таксономические показатели для каждого из них, какие знания собираются для каких микроорганизмов, какие микроорганизмы популярны в базах данных и не представлены в коллекциях культур, какие микроорганизмы представлены в коллекциях культур, но не представлены в базах данных, в каких коллекциях культур представлен каждый микроорганизм, в каких форматах хранения, какие свойства, цены, контакты и т. д. Если один и тот же микроорганизм имеет разные свойства в разных коллекциях культур, строится анализ этих различий.

Для уточнения схем и модулей далее создаются пробные упрощенные реальные решения, чтобы точнее анализировать систему в целом.

Постановка проблемы интеграции биологических баз данных с информацией о доступных штаммах микроорганизмов, поддерживаемых в европейских коллекциях культур, имеет особое значение для сохранения и уточнения знаний, накопленных в биологии, медицине, биотехнологии и также в плане обеспечения биотехнологической безопасности и независимости России от внешних рисков.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-246-247

INTEGRATION OF RUSSIAN MICROBIAL GENETIC RESOURCES IN EUROPEAN SYSTEM HORIZON 2020

Vasilenko A.N., Vasilenko M.A., Stupar O.S., Kochkina G.A., Ozerskaya S.M.

All-Russian Collection of Microorganisms, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences (IBPM RAS)

Pushchino, Russia

142290 Russia, Moscow Region, Pushchino, Prospect Nauki, 5

e-mail: vanvkm@gmail.com

A scheme of organizing the integration of information flows about microbial genetic resources supported by the European Biological Resource Centers (MBRC) with biological databases of the Life Science system is presented.

Key words: genetic resources, databases, Life Science, collections of microorganisms

This problem was posed in connection with the need to determine where one can find and get for work one or another culture of a microorganism for which fundamental or applied research has been carried out, with the publication of the data in scientific journals or their storage in specialized databases.

In order to fulfill this task, employees of the All-Russian Collection of Microorganisms (VKM, IBPM RAS, FIC PNCI RAS) received the opportunity to participate in two international projects of the HORIZON 2020 system, namely:

1. INFRAEOSC-04-2018. Research and Innovation Action (RIA) 2018-2022. Grant Agreement No.: 824087. Acronym: EOSC-Life. Full Title: «Providing an open collaborative space for digital biology in Europe».

2. INFRADEV-03-2019. Research and Innovation Action 2020-2023. Project N°.: 871129. Acronym: IS_MIRRI21. Full Title: «Implementation and Sustainability of Microbial Resource Research Infrastructure for 21st Century».

The report presents the work of VKM and other Russian microbial collections in construction of computer communications, assessment of indexes of use of microorganisms in biological databases with a description of specific modules and data blocks. The final step is called "inventorisation" that make an inspection which microorganisms are presented in European community, in which practical areas each of them is used and how, taxonomical indexes for each of them, which knowledge is collected for which microorganisms, which microorganisms are popular in databases and not presented in culture collections, which microorganisms are presented in culture collections but not presented in databases, in which Culture Collections each microorganism is presented in which storage formats, which properties, prices, contacts, etc. The conflicts in knowledge, if the same microorganism has not the same properties in different Culture Collections are subject of additional analysis.

Currently, trial simplified real solutions on real objects are further created for more accurate vision of the system as a whole.

The problem of integrating biological databases with information on the strains of microorganisms supported in European culture collections is of particular importance for preserving and refining the knowledge gained in biology, medicine, biotechnology and also in terms of ensuring biotechnological safety and independence of Russia from external risks.

УДК 615.015.11:577.29:004.032.26:616.379-008.64 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-248-249

ПОИСК МЕТОДОМ НЕЙРОСЕТЕВОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ КОНДЕНСИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА С МУЛЬТИТАРГЕТНОЙ RAGE-ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ

Васильев П.М.¹, Жуковская О.Н.², Спасов А.А.¹, Морковник А.С.², Кочетков А.Н.¹

¹ Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

400131, Волгоград, пл. Павших борцов, д. 1

e-mail: pvassiliev@mail.ru

² Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

344006, Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, д. 105/42

С помощью мультитаргетной нейросетевой модели RAGE-ингибирующей активности выполнен консенсусный виртуальный скрининг библиотеки новых конденсированных производных бензимидазола. Найдены соединения с выраженным RAGE-ингибирующим действием.

Ключевые слова: ингибиторы RAGE; искусственные нейронные сети; производные бензимидазола; консенсусный виртуальный скрининг.

С помощью технологии искусственных нейронных сетей была построена мультитаргетная модель зависимости RAGE-ингибирующей активности химических соединений от расчетных показателей их аффинности к белкам-мишеням сигнального пути RAGE–NF-κB [1, 2]. Для целей виртуального скрининга активных RAGE-ингибиторов сформирована фокусированная библиотека полученных в результате синтеза 105 новых конденсированных производных бензимидазола. Из них 39 структур являются трициклическими, а остальные 66 – бициклическими производными бензимидазола и его аналогов. Среди всех 105 соединений 79 включают в качестве заместителя структуру бифенила. Известно, что бензимидазол и бифенил являются так называемыми «привилегированными подструктурами» [3]. Поэтому можно ожидать, что соединения, включающие эти фрагменты, способны проявлять несколько видов фармакологической активности и, следовательно, будут обладать мультитаргетными свойствами. По схеме [2] методами молекулярной механики и квантовой химии построены оптимизированные 3D-модели 105 новых производных бензимидазола, проведен их ансамблевый докинг в сайты белков-мишеней сигнального пути RAGE–NF-κB и рассчитаны оценки аффинности новых структур к каждой биомишени в виде минимальных энергий докинга. Далее на основе полученных данных об аффинности с использованием ансамбля нейросетей осуществлен прогноз RAGE-ингибирующей активности изучаемых соединений по уровням «высокая», «высокая или умеренная», «активно». Консенсусное обобщение для каждой молекулы прогнозных оценок, полученных для трех указанных уровней активности, позволило выявить 17 перспективных соединений с ожидаемым высоким RAGE-ингибирующим действием. Это 4 трициклических и 13 бициклических производных бензимидазола, среди них 12 структур содержат в качестве заместителя фрагмент бифенила. Найденные в результате виртуального скрининга перспективные вещества переданы на экспериментальное тестирование. Выявленные среди производных бензимидазола высокоактивные системные полифункциональные мультитаргетные RAGE-ингибиторы являются основой для создания принципиально новых лекарственных препаратов для лечения патий при сахарном диабете и болезни Альцгеймера.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-015-00499).

Литература

1. Vassiliev P.M., Spasov A.A., Yanaliyeva L.R., Kochetkov A.N., Vorfolomeyeva V.V., Klochkov V.G., Appazova D.T. Neural network model of the RAGE–NF-κB signaling pathway // International congress «Biotechnology: state of the art and perspectives»: Congress proceedings (M., 25-27 feb. 2019). – M.: LLC «RED GROUP», 2019. – P. 357-358.
2. Vassiliev P.M., Spasov A.A., Yanaliyeva L.R., Kochetkov A.N., Vorfolomeyeva V.V., Klochkov V.G., Appazova D.T. Neural network modeling of multitarget RAGE inhibitory activity // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2019. – Vol. 13. – No. 3. – P. 256-263.
3. Horton D.A., Bourne G.T., Smythe M.L. The combinatorial synthesis of bicyclic privileged structures or privileged substructures // Chemical Reviews. – 2003. – V. 103. – Iss. 3. – P. 893-930.

SEARCHING BY METOD OF NEURAL NETWORK MODELING OF CONDENSED BENZIMIDAZOLE DERIVATIVES WITH MULTI-TARGET RAGE-INHIBITORY ACTIVITY

Vassiliev P.M.¹, Zhukovskaya O.N.², Spasov A.A.¹, Morkovnik A.S.², Kochetkov A.N.¹

¹ Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia
400131, Volgograd, Pavshikh bortsov sq., 1
e-mail: pvassiliev@mail.ru

² Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia
344006, Rostov-on-Don, Bolshaya Sadovaya Str., 105/42

Using a multitarget neural network model of RAGE-inhibitory activity, a consensus virtual screening of a library of new condensed benzimidazole derivatives was performed. Compounds with a essential RAGE-inhibitory effect have been found.

Key words: RAGE inhibitors; artificial neural networks; benzimidazole derivatives; consensus virtual screening.

Using the technology of artificial neural networks, a multitarget model of the dependence of the RAGE-inhibitory activity of chemical compounds on the calculated indices of their affinity for target proteins of the RAGE-NF- κ B signaling pathway was built [1, 2]. For the purpose of virtual screening of active RAGE inhibitors, a focused library of 105 new condensed benzimidazole derivatives obtained as a result of synthesis was formed. Of these, 39 structures are tricyclic, and the remaining 66 are bicyclic derivatives of benzimidazole and its analogs. Of all 105 compounds, 79 include biphenyl as a substituent. It is known that benzimidazole and biphenyl are the so-called "privileged substructures" [3]. Therefore, it can be expected that compounds containing these fragments are capable of exhibiting several types of pharmacological activity and, therefore, will have multitargeting properties. According to the scheme [2], optimized 3D models of 105 new benzimidazole derivatives were constructed using molecular mechanics and quantum chemistry methods, their ensemble docking into the sites of target proteins of the RAGE-NF- κ B signaling pathway was carried out. Estimates of the affinity of new structures to each biotarget were calculated in the form of minimum docking energies. Further, on the basis of the obtained data on the affinity using an ensemble of neural networks, a prediction of the RAGE-inhibitory activity of the studied compounds was carried out according to the levels of "high", "high or moderate", "active". Consensus generalization for each molecule of predictive estimates obtained for the three indicated activity levels identified 17 promising compounds with the expected high RAGE-inhibitory activity. These are 4 tricyclic and 13 bicyclic benzimidazole derivatives, among them 12 structures contain a biphenyl fragment as a substituent. The promising substances found as a result of virtual screening were transferred for experimental testing. Highly active systemic multifunctional multitarget RAGE inhibitors identified among benzimidazole derivatives are the basis for the creation of fundamentally new drugs for the treatment of pathies in diabetes mellitus and Alzheimer's disease.

This work was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (project 18-015-00499).

References

1. Vassiliev P.M., Spasov A.A., Yanaliyeva L.R., Kochetkov A.N., Vorfolomeyeva V.V., Klochkov V.G., Appazova D.T. Neural network model of the RAGE-NF- κ B signaling pathway // International congress «Biotechnology: state of the art and perspectives»: Congress proceedings (M., 25-27 feb. 2019). – M.: LLC «RED GROUP», 2019. – P. 357-358.
2. Vassiliev P.M., Spasov A.A., Yanaliyeva L.R., Kochetkov A.N., Vorfolomeyeva V.V., Klochkov V.G., Appazova D.T. Neural network modeling of multitarget RAGE inhibitory activity // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2019. – Vol. 13. – No. 3. – P. 256-263.
3. Horton D.A., Bourne G.T., Smythe M.L. The combinatorial synthesis of bicyclic privileged structures or privileged substructures // Chemical Reviews. – 2003. – V. 103. – Iss. 3. – P. 893-930.

УДК 573.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-250-252

ПРЕДСКАЗАНИЕ ПАТОГЕННОСТИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В БЕЛКАХ BRCA1 И BRCA2 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ MNA ДЕСКРИПТОРОВ И НАИВНОГО БАЙЕСОВСКОГО КЛАССИФИКАТОРА

Задорожный А.Д.¹, Филимонов Д.А.², Лагунин А.А.^{1,2}

¹ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России
Москва, Россия, 117997, ул. Островитянова, д. 1

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича», Москва, Россия, 119121, Москва, ул. Погодинская 10/8
e-mail: zad-anton@yandex.ru

Для построения классификационных моделей предсказания патогенности аминокислотных (АМК) замен на основе MNA дескрипторов целесообразно использовать данные о химических структурах пептида с АМК заменой и соответствующие участки последовательности белка без мутации.

Ключевые слова: АМК, аминокислотные замены, белки BRCA1 и BRCA2, предсказание патогенности мутации, соотношения структура-активность, PASS

Однонуклеотидные полиморфизмы вносят основной вклад в генетические различия людей [1]. Расположенные в белок-кодирующих генах мутации могут изменять АМК остатки и нарушать функции белков [2]. Современные методы предсказания влияния на стабильность и функцию белков человека АМК замен используют однобуквенное описание АМК остатков в белках. В данной работе представлен новый подход, основанный на анализе связи «структура-активность» с использованием атомно-центрированных фрагментных дескрипторов многоуровневых атомных окрестностей (MNA) [3] для описания химической структуры пептидов с заменой и без замены АМК остатков.

Цель исследования: Разработать методы подготовки данных, найти длину пептида, в центре которого находится АМК замена, и уровень MNA дескрипторов, оптимальные для построения классификационных моделей, разделяющих патогенные АМК замены от непатогенных.

Материалы и методы: АМК последовательности белков BRCA1 и BRCA2 (референсные последовательности в формате fasta) и аннотированные АМК замены в них (как непатогенные, так и патогенные варианты) из базы данных UniProt [4]. С помощью Python 3.7 и библиотеки pybel [5] из АМК последовательностей обоих белков созданы выборки в формате SD файлов, описывающих пептиды в виде структурных формул, позицию АМК замены в белке и индикаторы эффекта (0-непатогенный вариант, 1-патогенная замена): 1) пептиды с АМК заменами (патогенные и непатогенные) и их окружение (от 3 до 8 АМК соседей с каждой стороны); 2) аналогичные выборки с нормальными вариантами (референсная АМК в позиции замены, пептиды той же длины); 3) выборка из целого белка, поделенного на фрагменты заданной длины (от 7 до 17 АМК). Классификационные модели были построены и валидированы в модифицированной версии программы PASS [3] с использованием разных (от 3 до 15) уровней MNA дескрипторов для описания химической структуры пептидов. Для оценки статистических различий между точностью лучших моделей при скользящем контроле с исключением по одному (LOO CV) и при 20-кратной кросс-валидации (20-fold CV) использовался критерий Манна-Уитни.

Результаты: С использованием трёх видов комбинаций выборок - 1), 2) и 3), - 6 различных длин пептидов и 13 уровней MNA дескрипторов построено 468 моделей. Модели, построенные на комбинации выборки 2), вне зависимости от длины пептида и вида белка, с 9-14 уровнями MNA дескрипторов показали наиболее высокую инвариантную точность прогноза (IAP), от 0.96 до 0.98 при LOO CV и от 0.91 до 0.96 при 20-fold CV. Показано отсутствие статистически значимого уменьшения IAP при проведении 20-fold CV.

Построены модели для предсказания патогенного эффекта АМК замены на основе анализа связи «структура-активность» по данным о химических структурах АМК замен и их окружения. Наиболее высокие значения IAP получены при обогащении данных примерами референсных пептидных структур (вариант 2). Нет статистически значимых различий результатов LOO CV и 20-fold CV, что говорит об устойчивости созданных классификационных моделей.

Литература

1. Collins F.S., Brooks L.D., Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. // *Genome Res.* 1998. Vol.8. P. 1229–1231.

2. Cargill M., Altshuler D., Ireland J., Sklar P., Ardlie K., Patil N., Shaw N., Lane C.R., Lim E.P., Kalyanaraman N. et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. // *Nat. Genet.* 1999. Vol.22. P. 231–238.
3. Poroikov V.V., Filimonov D.A., Borodina Yu.V., Lagunin A.M.A., Kos A. Robustness of biological activity spectra predicting by computer program PASS for non-congeneric sets of chemical compounds. // *J.Chem.Inf.Comput.Sci.* 2000. Vol.40. №6. P. 1349-1355.
4. UniProt: <https://www.uniprot.org/docs/humsavar> (дата обращения: 29.04.2020)
5. Pybel documentation: https://openbabel.org/docs/current/UseTheLibrary/Python_Pybel.html (дата обращения: 29.04.2020)

UDC 573.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-250-252

PREDICTION OF PATHOGENIC EFFECT FOR AMINO ACID SUBSTITUTIONS IN BRCA1 AND BRCA2 PROTEINS USING MNA DESCRIPTORS AND NAIVE BAYES CLASSIFIER

Zadorozhny A.D.¹, Filimonov D.A.², Lagunin A.A.^{1,2}

¹ Pirogov Russian National Research Medical University
Ostrovitianov str. 1, Moscow, 117997, Russia

² Institute of Biomedical Chemistry
Pogodinskaya str. 10/8, Moscow, 119121, Russia
e-mail: zad-anton@yandex.ru

It is advisable to use data peptide's chemical structures with amino acids (AMA) substitution and the corresponding sections of the protein sequence without mutation to construct classification models predicting the pathogenic effects AMA substitutions based on MNA descriptors.

Key words: amino acid substitution, BRCA1, BRCA2, prediction of mutation effect, structure-activity relationship, PASS

Single nucleotide polymorphisms make the main contribution to human genetic differences [1]. Mutations located in protein-coding genes can alter AMA residues and disrupt protein functions [2]. Modern methods for predicting the effect of AMA substitutions on the stability and function of human proteins use the one-letter description of AMA residues in proteins. This work presents a new approach based on the analysis of the structure – activity relationship using atom-centered substructural Multilevel Neighborhoods of Atoms (MNA) descriptors [3] to describe the chemical structure of peptides with and without substitution of AMA residues.

The aim of the study is determination of methods for data preparation, peptides length and level of MNA descriptors to make the most reliable classification models for prediction of pathogenic AMA substitutions.

Materials and methods: BRCA1 and BRCA2 proteins (reference sequences in fasta format) and their annotated AMA substitutions (both non-pathogenic and pathogenic variants) from UniProt database (humvar data) [4] were used. Python 3.7 and the pybel library [5], samples of both proteins were used to create SD files describing peptides in the form of structural formulas, position AMA substitutions in the proteins and effect indicators (0-non-pathogenic variant, 1-pathogenic replacement): 1) peptides with AMA substitutions (pathogenic and non-pathogenic) and their neighbors (from 3 to 8 AMA on each side); 2) similar peptides with reference AMA in position of the substitution (same length); 3) a set from peptides of fixed length (from 7 to 17 AMA) generated from a whole protein sequence. Classification models were created and validated in a modified version of the PASS software [3], which allows using different levels of MNA descriptors to describe the chemical structure of peptides. From 3 to 15 levels of MNA descriptors were used. The Mann-Whitney test was used to assess the statistical differences between the accuracy of the best models with leave-one-out (LOO CV) and 20-fold cross-validations (5%out CV).

Results: Three types of combinations of sets were used: 1, 2 and 3, - 6 different peptide lengths and 13 levels of MNA descriptors, 468 models were created. Models based on a combination of sets number 2, regardless peptide length and protein type, with 9-14 levels of MNA descriptors showed the highest invariant prediction accuracy (IAP), from 0.96 to 0.98 for LOO CV and from 0.91 to 0.96 for 20- fold CV. The absence of a statistically significant decrease in IAP after a 20-fold CV was shown.

The classification models have been created to predict the pathogenic effect of mutations based on the analysis of structure-activity relationship data of AMA substitutions and their surroundings. The highest IAP values

were obtained by enriching the data with examples of reference peptide structures (the set 2). There were no statistically significant differences between the results of LOO CV and 20-fold CV. It indicates the stability of the created classification models.

References

1. Collins F.S., Brooks L.D., Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. // *Genome Res.* 1998. Vol.8. P. 1229–1231.
2. Cargill M., Altshuler D., Ireland J., Sklar P., Ardlie K., Patil N., Shaw N., Lane C.R., Lim E.P., Kalyanaraman N. et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. // *Nat. Genet.* 1999. Vol.22. P. 231–238.
3. Poroikov V.V., Filimonov D.A., Borodina Yu.V., Lagunin A.M., Kos A. Robustness of biological activity spectra predicting by computer program PASS for non-congeneric sets of chemical compounds. // *J.Chem.Inf.Comput.Sci.* 2000. Vol.40. №6. P. 1349-1355.
4. UniProt: <https://www.uniprot.org/docs/humsavar> (date of the usage: 29.04.2020)
5. Pybel documentation: https://openbabel.org/docs/current/UseTheLibrary/Python_Pybel.html (date of the usage: 29.04.2020)

УДК 613.26:547:004 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-252-254

СОЗДАНИЕ БАЗЫ ДАННЫХ ПИЩЕВЫХ РАСТЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЯ С ПОЛЕЗНЫМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ

Зайцев В.Г., Иващенко Р.Ю., Агапова Д.А., Желтова А.А.

Федеральный Научный Центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской Академии Наук, Волгоград, Россия
 400062, Волгоград, пр. Университетский 97
 e-mail: zaitsev@vifanc.ru

Описаны принципы разработки базы данных, содержащей информацию о химических компонентах пищевых растений, их влиянии на здоровье человека и молекулярных маркерах, ассоциированных с их повышенной продукцией – FPHC&Mdb (Food Plant Health Compounds & molecular Markers database)

Ключевые слова: база данных; пищевые растения; химические соединения; биоинформатика.

Многие биологически активные соединения растительного происхождения обладают благоприятным действием на здоровье человека. Употребление в пищу растений с более высоким содержанием таких полезных соединений может способствовать снижению риска заболеваемости [1]. Повышенная продукция полезных веществ в растениях может быть ассоциирована с определенными полиморфными вариантами последовательностей ДНК – молекулярными маркерами. Такие ДНК-маркеры можно использовать для отбора вариантов растений с более высокой степенью полезности для здоровья человека. Однако эффективный скрининг с помощью молекулярных маркеров требует совокупной информации о: (1) химическом составе пищевых растений; (2) результатах медицинских исследований этих растений или их химических компонентов; (3) молекулярных и белковых маркерах, ассоциированных с продукцией определенных химических соединений. На данный момент такая комплексная база данных не существует.

Целью нашего исследования является разработка базы данных, объединяющей информацию о химических компонентах пищевых растений, их влиянии на здоровье человека и молекулярных маркерах, ассоциированных с их повышенной продукцией – FPHC&Mdb (Food Plant Health Compounds & molecular Markers database).

Критерии отбора информации для наполнения базы данных (рис. 1)

В результате 144 культуры, относящиеся к 12 семействам, которые отвечали данным критериям выбора, были включены в FPHC&Mdb. Для формирования выборки химических соединений был проведен скрининг химических, ботанических, агробиологических баз данных, научных публикаций с информацией о химическом составе пищевых растений. Сопоставление списка индивидуальных химических соединений позволило выявить 412 соединений, обнаруженных в сельскохозяйственных культурах. По выбранным химическим соединениям был проведен первичный поиск клинических и эпидемиологических исследований. Молекулярные маркеры, ассоциированные с повышенной продукцией полезных для здоровья человека соединений, были выявлены для 32 культур. Полученный набор данных был включен в первую версию FPHC&Mdb, организованную в файлах форматов XML или sqlite для просмотра через оболочку CherryTree и в виде базы данных под управлением СУБД BaseX.

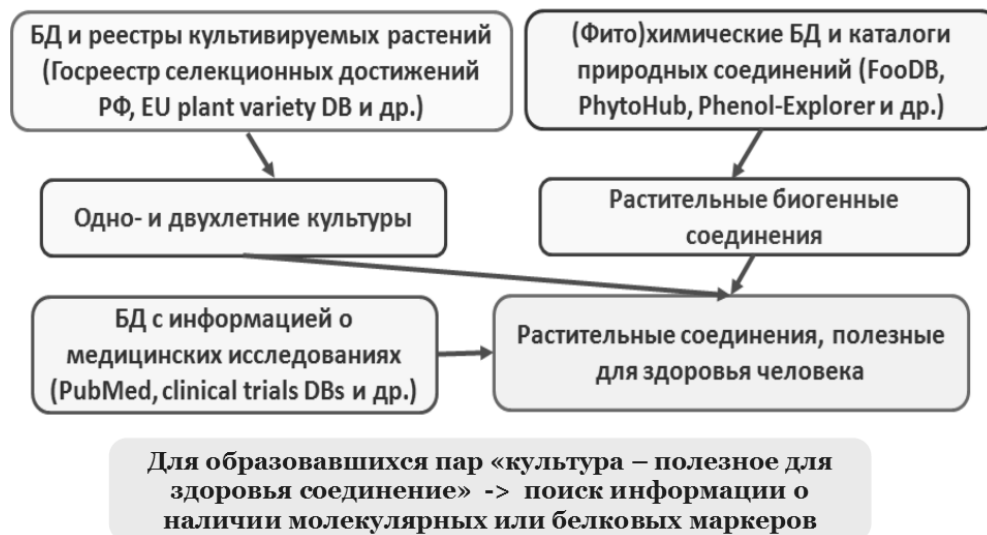


Рисунок 1. Алгоритм разработки базы данных FPHC&Mdb

Литература

1. Hansson S.O., Aman P., Becker W. et al. Breeding for public health: A strategy // Trends Food Sci Technol. 2018. V. 80/ P. 131-40.

UDC 613.26:547:004 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-252-254

DEVELOPMENT OF A DATABASE OF FOOD PLANTS CONTAINING HEALTH BENEFICIAL COMPOUNDS

Zaitsev V.G., Ivashchenko R.Yu., Agapova D.A., Zheltova A.A.

Federal Research Centre of Agroecology, Complex Melioration, and Forest Reclamations RAS
400062, Volgograd, Universitetskij Prospekt, 97
e-mail: zaitsev@vfanc.ru

We described principles of a development of database containing data about chemical composition of food plants, effects of plant compounds on human health and molecular marker, associated with elevated production of noted compounds – FPHC&Mdb (Food Plant Health Compounds & molecular Markers database).

Key words: database; food plants; compounds; bioinformatics.

Many plant-derived biologically active compounds have beneficial effects on the human health. Consumption of food plants with higher content of health-promoting compounds could reduce risk of morbidity [1]. Elevated synthesis of beneficial compounds in plants can be associated with specific polymorphic variants of DNA sequences named molecular markers. These DNA-based markers could be used in screening of plant cultivars with improved health benefits. However, effective molecular marker-assisted plant screening needs presence of combined information about: (1) chemical composition of food plants; (2) results of clinical studies of food plants or their chemical constituents; (3) molecular and protein markers associated with health beneficial compounds. Similar combined database hasn't been developed yet.

The aim of our study is development of a database combining data about chemical constituents of food plants, their effects on the human health and molecular markers associated with elevated production of health-providing compounds – FPHC&Mdb (Food Plant Health Compounds & molecular Markers database).

Criteria for data search and mining are noted in figure 1.

Consequently, 144 agricultural plants from 12 families related to noted criteria were included in FPHC&Mdb. To form chemical compounds set data search in chemical, botanical, agrobiological databases and scientific publications about food plant chemical composition was performed. Matching of the plant list and compounds set allowed to identify 412 compounds of interest detected in agricultural plants. For the selected compounds primary searching of clinical trials and epidemiological studies was made. Molecular markers associated with elevated

production of the health beneficial compounds were identified for 32 agricultural plants. The resulting dataset was included in FPHC&Mdb v.1.0 organized as XML and sqlite file formats for viewing CherryTree software and as database for BaseX DBMS.

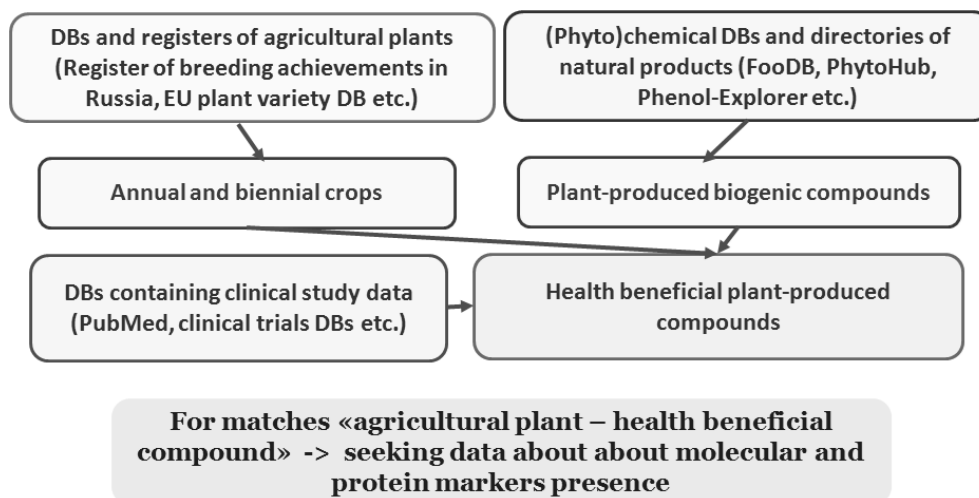


Figure 1. Algorithm for the development of FPHC&Mdb database.

References

1. Hansson S.O., Aman P., Becker W. et al. *Breeding for public health: A strategy* // *Trends Food Sci Technol*. 2018. V. 80/ P. 131-40.

УДК: 577.112.7, ББК: 52.81 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-254-256

ПРОГНОЗ БЕЛОК-ЛИГАНДНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ IN SILICO

Д.А.Карасев¹, Д.А.Филимонов¹, Б.Н.Соболев¹, А.А.Лагунин²

¹ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Россия, 119121, Москва, Погодинская, 10, e-mail: w.dmitrykarasev@gmail.com, +79165554694, e-mail: dmitry.filimonov@ibmc.msk.ru, e-mail: boris.sobolev@ibmc.msk.ru

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Россия, 117997, Москва, Островитянова, 1, e-mail: alexey.lagunin@ibmc.msk.ru

Разработан подход для компьютерного прогноза взаимодействия белков человека с низкомолекулярными соединениями. В качестве входных данных используются аминокислотные последовательности белков-мишеней и структурные описания низкомолекулярных соединений. Метод протестирован на семействах белков, представляющих перспективные лекарственные мишени. Показана высокая эффективность предсказания лиганд-белковых взаимодействий.

Ключевые слова: Протеохемометрика, белок-лигандные взаимодействия, белки-мишени

Компьютерное предсказание взаимодействий «белок-лиганд» - важный этап поиска фармакологических веществ. Такие подходы позволяют значительно снизить затраты при поиске новых лекарственных соединений.

Для компьютерного прогноза белок-лигандных взаимодействий используются различные методики. Эффективным является предсказание белков-мишеней по сходству тестируемого соединения уже известными лигандами. Однако, такой подход неприменим в ситуации, когда для белка-мишени неизвестно ни одного лиганда. С другой стороны, существуют методы молекулярного моделирования. Для таких подходов важно наличие хотя бы одной структуры, что не всегда достижимо, например, в случае мембранных белков.

В данной работе мы разработали подход для прогноза взаимодействий «белок-лиганд» на основе анализа комбинированного пространства низкомолекулярных соединений и аминокислотных последовательностей белков. В программах, реализующий данный принцип, для прогноза взаимодействий «белок-лиганд» часто используют интегральные оценки сходства аминокислотных последовательностей. Это

не позволяет учитывать вклад отдельных аминокислотных остатков в формировании специфичности белка к лиганду. Мы предлагаем использовать оригинальную методику, основанную на оценке локального сходства последовательностей. Ранее мы показали, что с помощью нашего подхода можно определять аминокислотные остатки, которые обуславливают связывание с лигандом [Карасев Д. и соавт. 2018]. Для описания лигандов применялись дескрипторы многоуровневых атомных окрестностей (MNA) [Д. Филимонов и соавт. 1999]. Метод протестирован с валидацией при пятикратном разбиении обучающей выборки с исключением одной части в качестве тестовой. Показана высокая эффективность подхода при прогнозе взаимодействий для белков мишеней человека [Карасев Д. и соавт. 2019].

Таким образом, была показана высокая эффективность предложенного подхода. Он может быть применен к широкому спектру белков, как человека, так и других видов.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-015-00374

Литература

1. Карасев Д.А., Веселовский А.В., Лагунин А.А., Филимонов Д.А., Соболев Б.Н. Распознавание аминокислотных остатков, обуславливающих специфичное взаимодействие протеинкиназ с низкомолекулярными ингибиторами // 2018 - Том 52 №3 - С 555-564
2. Filimonov D., Poroikov V., Borodina Yu., Glorizova T., Chemical Similarity Assessment through Multilevel Neighborhoods of Atoms: Definition and Comparison with the Other Descriptors // J. Chem. Inf. Comput. Sci. 1999. 39. 666-670
3. Karasev D., Sobolev B., Lagunin A., Filimonov D., Poroikov V. Prediction of Protein-Ligand Interaction Based on the Positional Similarity Scores Derived from Amino Acid Sequences // Int J Mol Sci. 2019. 21(1). pii: E24

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-254-256

IN SILICO PREDICTION OF PROTEIN-LIGAND INTERACTIONS

D.Karasev¹, D.Filimonov¹, B.Sobolev¹, A.Lagunin²

¹ Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Russia, 119121, Moscow, Pogodinskaya, 10

² Pirogov Medical University, Russia, 117997, Moscow, Ostrovityanova, 1

The method for computer prediction of protein-ligand interactions was developed. The amino acid sequences of target proteins and structural descriptions of small molecule ligands are used as the input data. The method was tested on protein families representing perspective drug targets. The developed approach allows one to predict ligand-protein interactions with high efficiency.

Key words: Proteochemometrics, protein-ligand interaction, drug-targets

Computational prediction of protein-ligand interaction is crucial step in drug discovery. In silico methods significantly reduce the costs of discovery new drug-like compounds.

Various approach are used for computational prediction of protein-ligand interactions. The effective way to predict a new ligand is the structural comparison of the tested compound with known ligands of the target. This approach is powerless for the new protein target. On the other hand, methods based on molecular modeling can overcome this limitation. In such case it is necessary to have at least one structure, that is not always possible e.g. for membrane protein.

We have developed computational approach to predict protein-ligand interaction based on analysis combined space of small molecule compounds and amino acid sequences of protein targets. The methods implemented this principle often used estimation based on the sequences alignment. It does not allow taking into account the impact of individual amino acid residues to the ligand specificity. We propose the original technique based on the assessment of local sequence similarity to predict protein-ligand interactions. Earlier, this approach allowed us to determine the amino acid residues responsible for ligand binding [Karasev D. et al. 2018]. We also use ligand descriptions using multi-level atomic neighborhood descriptors (MNAs) [D. Filimonov et al., 1999]. Validation was carried out with a fivefold partitioning of the training sample with the exception of one part as a test one. The high efficiency of the method is shown in the prediction of interactions for human target proteins [Karasev D. et al. 2019].

Thus, the high efficiency of the proposed approach was shown. It can be applied to a wide range of proteins, both human and other organisms.

Grant: The reported study was funded by RFBR according to the research project № 19-015-00374

References

1. Karasev D.A., Veselovsky A.V., Lagunin A.A., Filimonov D.A., Sobolev B.N. Determination of Amino Acid Residues Responsible for Specific Interaction of Protein Kinases with Small Molecule Inhibitors // *Mol Biol (Mosk)*. 2018. 52(3):555-564.
2. Filimonov D., Poroikov V., Borodina Yu., Glorizova T., Chemical Similarity Assessment through Multilevel Neighborhoods of Atoms: Definition and Comparison with the Other Descriptors // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1999. 39. 666-670
3. Karasev D., Sobolev B., Lagunin A., Filimonov D., Poroikov V. Prediction of Protein-Ligand Interaction Based on the Positional Similarity Scores Derived from Amino Acid Sequences // *Int J Mol Sci.* 2019. 21(1). pii: E24

УДК: 577.21 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-256-257

МНОЖЕСТВЕННОЕ ВЫРАВНИВАНИЕ ПРОМОТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ИЗ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА

Коротков Е.В.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия, Институт биоинженерии, 117312, Москва, пр-т 60-летия Октября д. 7, корп.1
 e-mail: bioinf@yandex.ru

Разработан новый алгоритм множественного выравнивания. С его помощью рассчитано выравнивание промоторных последовательностей из генома человека. На основе рассчитанных множественных выравниваний создано 17 классов промоторных последовательностей.

Ключевые слова: множественное выравнивание, промоторные последовательности

Мы разработали новый математический метод для создания множественного выравнивания для сильно различающихся нуклеотидных последовательностей (MAVDS). Под сильно различающимися последовательностями будем понимать последовательности, накопившие более 2.5 случайных замен (x) на один нуклеотид относительно друг друга. MAVDS позволяет строить статистически значимые выравнивания для x в интервале от 2.5 до 4.4. Мы показали, что ранее разработанные алгоритмы могут строить статистически значимые множественные выравнивания до $x < 2.4$. MAVDS был применен для построения множественного выравнивания и классификация промоторных последовательностей из генома *H.sapiens* (-499+1). Наша оценка показала, что для промоторных последовательностей $x=3.6$. Поэтому статистически значимое множественное выравнивание промоторов не было создано ранее. Всего было получено 17 статистически достоверных классов промоторных последовательностей с размерами классов от 3000 до 200 промоторов из генома *H.sapiens*. В данной работе показано, что многие районы промоторных последовательностей от -499 до +1 являются сильно консервативными. Полученные классы позволяют идентифицировать потенциальные промоторные последовательности в генома *H.sapiens* с числом ложных позитивов не более 10^3 соответственно.

UDC: 577.21 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-256-257

MULTIPLE ALIGNMENT OF PROMOTER SEQUENCES FROM HUMAN GENOM

Korotkov E.V.

Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow, Russia
 Institute of Bioengineering, 117312, Moscow, pr-t 60 anniversary of October 7, building 1
 e-mail: bioinf@yandex.ru

A new multiple alignment algorithm has been developed. With its help, the alignment of promoter sequences from the human genome is calculated. Based on the calculated multiple alignments, 17 classes of promoter sequences were created.

Key words: multiple alignment, promoter sequences

We developed a new mathematical method for creating multiple alignment for very different nucleotide sequences (MAVDS). By very different sequences, we mean sequences that have accumulated more than 2.5 random

substitutions (x) for one nucleotide relative to each other. MAVDS constructs statistically significant alignments for x in the range from 2.5 to 4.4. We have shown that previously developed algorithms can build statistical significant multiple alignments up to $x < 2.4$. MAVDS has been used to construct multiple alignment and classification of promoter sequences from the *H.sapiens* genome (-499 - +1). Our assessment showed that for promoter sequences $x=3.6$. Therefore, statistically significant multiple alignment of promoters has not been created previously. A total of 17 statistically significant classes of promoter sequences from the *H.sapiens* genome were obtained with class sizes from 3,000 to 200 promoters. It is shown that many regions of promoter sequences from -499 to +1 are highly conserved. The classes obtained may identify potential promoter sequences in the *H.sapiens* genome with the number of false positives not exceeding 10^3 , respectively.

УДК 615.015.11:004.852: 616.379-008.64 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-257-258

МОДЕЛИРОВАНИЕ АНТИГЛИКИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ

Литвинов Р.А., Васильев П.М.

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия
400131, Волгоград, пл. Павших борцов, д. 1
e-mail: litvinov.volggmu@mail.ru

Методами машинного обучения с помощью IT Microcosm построена многоуровневая консенсусная модель антигликирующей активности химических соединений.

Ключевые слова: антигликирующая активность; in silico; IT Microcosm; стратегии прогноза; многоуровневая консенсусная модель.

На основе информации из ChEMBL [1] сформирована база данных по структуре и антигликирующей активности известных соединений. Структурные формулы, данные по активности и методики исследований были верифицированы квалифицированными экспертами, химиками и фармакологами. Данные по антигликирующей активности были кластеризованы в 4 класса: «высокая», «умеренная», «низкая», «неактивно». С помощью IT Microcosm [2] на основе консенсуса стратегий прогноза построена многоуровневая модель антигликирующей активности химических соединений. Методом скользящего контроля выполнено тестирование точности полученной модели, которая составила: в консервативной стратегии 77%, 84%, 83%; в нормальной стратегии 75%, 88%, 89%; в рискованной стратегии 84%, 87%, 87% – для уровней активности «высокая», «высокая или умеренная», «активно», соответственно. Высокая активность лучше всего прогнозируется в рискованной стратегии, а выраженная и наличие активности – в нормальной стратегии. Полученные результаты свидетельствуют о том, данные по антигликирующей активности известных соединений были адекватно обработаны и валидно соотносятся с их химической структурой. Найденная с помощью IT Microcosm многоуровневая консенсусная модель антигликирующей активности химических соединений будет использована для продолжения ранее начатого направленного поиска новых соединений с антигликирующим действием [3, 4].

Работа проведена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых ученых – кандидатов наук, МК-1887.2020.7.

Литература

1. ChEMBL: a manually curated database of bioactive molecules with drug-like properties. URL: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/> (дата обращения: 19.05.2020).
2. Vassiliev P.M., Spasov A.A., Kosolapov V.A., Kucheryavenko A.F., Gurova N.A., Anisimova V.A. Consensus Drug Design Using IT Microcosm. In Application of Computational Techniques in Pharmacy and Medicine / Eds. L. Gorb, V. Kuz'min, E. Muratov – Vol. 17. – Dordrecht (Netherlands): Springer Science + Business Media, 2014. – 550 p. – P. 369-431.
3. Savateev K., Fedotov V., Butorin I., Eltsov O., Slepukhin P., Ulomsky E., Rusinov V., Litvinov R., Babkov D., Khokhlacheva E., Radaev P., Vassiliev P., Spasov A. Nitrothiadiazolo[3,2-a]pyrimidines as promising antiglycating agent // Eur J Med Chem. 202. Vol 185. Art. No. 111808.
4. Spasov A.A., Brel A.K., Litvinov R.A., Lisina S.V., Kucheryavenko A.F., Budaeva Yu.N., Salaznikova O.A., Rashchenko A.I., Shamshina D.D., Batrakov V.V., Ivanov A.V. Evaluation of N-hydroxy-, N-methoxy-, and N-acetoxybenzoyl-substituted derivatives of thymine and uracil as new substances for prevention and treatment of long-term complications of diabetes mellitus // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2018. Vol. 44. № 6. P. 769-777.

UDC 615.015.11:004.852: 616.379-008.64 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-257-258

ANTIGLYCATION ACTIVITY MODELING BY THE METHODS OF MACHINE LEARNING

Litvinov R.A., Vasiliev P.M.

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation
400131, 1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd,
e-mail: litvinov.volggu@mail.ru

A multilevel consensus model of the antiglycation activity has been built by the machine learning methods using IT Microcosm.

Key words: antiglycation activity; in silico; IT Microcosm; prediction strategies; multilevel consensus model.

On the basis of ChEMBL open source [1], the structure-activity database of the reference antiglycation compounds had been created. Structural formulas, activity and research method have been verified by qualified experts, chemists and pharmacologists. Data on antiglycation activity had been clustered into 4 classes depends on the activity level: "high", "moderate", "low", "inactive". By the usage of IT Microcosm [2] a multilevel model of the chemical compounds' antiglycation activity had been built (based on the consensus of prediction strategies). The leave-one-out cross validation method was used for accuracy verification of the final model. The results of the accuracy assessment: conservative strategy gives 77%, 84%, 83%; normal strategy gives 75%, 88%, 89%; risk strategy gives 84%, 87%, 87% of accuracy – for the activity levels "high", "high/moderate", "high/moderate/low", respectively. High activity level has been better predicted by the risk strategy, manifested activity (if any activity level is presented) has been better predicted by the normal strategy. The results obtained, indicate that the data on the antiglycation activity of the reference compounds have been adequately processed and are validly correlated with their chemical structure. The multilevel consensus model of the antiglycation activity of the chemical compounds obtained by the usage of IT Microcosm will be used for the target-oriented searching for new antiglycation compounds, which was started early [3, 4].

Investigation was carried out under financial support of the grant of the President of the Russian Federation for young scientists – candidates of sciences, MK-1887.2020.7.

References

1. ChEMBL: a manually curated database of bioactive molecules with drug-like properties. URL: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/> (date of the application: 19.05.2020).
2. Vassiliev P.M., Spasov A.A., Kosolapov V.A., Kucheryavenko A.F., Gurova N.A., Anisimova V.A. Consensus Drug Design Using IT Microcosm. In Application of Computational Techniques in Pharmacy and Medicine / Eds. L. Gorb, V. Kuz'min, E. Muratov – Vol. 17. – Dordrecht (Netherlands): Springer Science + Business Media, 2014. – 550 p. – P. 369-431.
3. Savateev K., Fedotov V., Butorin I., Eltsov O., Slepukhin P., Ulomsky E., Rusinov V., Litvinov R., Babkov D., Khokhlacheva E., Radaev P., Vassiliev P., Spasov A. Nitrothiadiazolo[3,2-a]pyrimidines as promising antiglycating agent // Eur J Med Chem. 202. Vol 185. Art. No. 111808.
4. Spasov A.A., Brel A.K., Litvinov R.A., Lisina S.V., Kucheryavenko A.F., Budaeva Yu.N., Salaznikova O.A., Rashchenko A.I., Shamshina D.D., Batrakov V.V., Ivanov A.V. Evaluation of N-hydroxy-, N-methoxy-, and N-acetoxybenzoyl-substituted derivatives of thymine and uracil as new substances for prevention and treatment of long-term complications of diabetes mellitus // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2018. Vol. 44. № 6. P. 769-777.

УДК 577.29 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-258-260

ПРЕДСКАЗАНИЕ ПОТЕРЬ ГЕНОВ НА ОСНОВЕ ГЕНОМНЫХ СТРУКТУР

Рубанов Л.И., Шиловский Г.А., Селиверстов А.В., Зверков О.А., Любецкий В.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук
127051, г. Москва, Большой Каретный переулок, д.19 стр. 1.
e-mail: lyubetsk@iitp.ru

Разработан эффективный алгоритм, реализованный в программе для многопроцессорных систем, позволяющий обнаруживать гены, потерянные или приобретённые в ходе эволюции большинством видов из

заданного множества. Предложенный подход учитывает взаимное расположение генов на хромосоме и позволяет одновременно рассматривать сотни видов.

Ключевые слова: ортологичные гены; синтения; потеря генов; эффективная компьютерная программа; оценка времени работы программы; суперкомпьютер.

Часто используемые методы выявления ортологов и паралогов включают филогенетический анализ, основанный на сравнении гомологичных последовательностей и согласовании деревьев, анализ локального расположения генов (синтении) и реконструкцию эволюционных сценариев на основе геномных структур (глобального расположения генов на хромосомах). Известно, что анализ последовательностей и синтении может привести к несовместимым результатам. Разработано большое число алгоритмов и программ, посвящённых анализу ортологичности и сопутствующим задачам. Существенной особенностью нашего подхода к поиску потерянных и приобретённых генов является совместное сравнение больших наборов видов. Программа *lossgainRSL* разработана для поиска генов, потерянных, приобретённых или сохранившихся в большинстве видов из заданных наборов. Алгоритм реализован в программе, позволяющей производить параллельные вычисления в среде MPI под управлением операционных систем Windows и Linux. Программа свободно доступна по адресу <http://lab6.iitp.ru/ru/lossgainrsl/>. Программа *lossgainRSL* имеет следующую схему. Для выбранного вида рассматриваются все его гены (с окрестностью фиксированного размера), присутствующие или отсутствующие в нескольких заданных на входе наборах видов. Условие отбора генов задаётся пользователем. Программа допускает работу с неполными геномами. Упомянутая окрестность гена (определяемая параметром программы) используется для проверки синтении в её пределах. Важно, что размер окрестности можно обоснованно выбирать. А именно, трёхмерная структура ДНК включает топологически ассоциированные домены, размеры которых определяют эту окрестность и представляются биологически обоснованными [1].

Время поиска ортолога заданного гена в заданной окрестности сравнимо со временем чтения таблиц ортологов и паралогов и ограничено линейной функцией от длины входа программы. Поэтому полное время работы программы ограничено полиномом второй степени от длины входа даже на однопроцессорной системе, что позволяет на многопроцессорной системе рассматривать одновременно сотни видов.

С помощью программы мы определили гены мыши, потерянные или ставшие псевдогенами у человека, но сохранившиеся (и кодирующие белки) у не менее чем четырёх из пяти человекообразных обезьян: *Gorilla gorilla*, *Nomascus leucogenys*, *Pan paniscus*, *Pan troglodytes* и *Pongo abelii*. Среди отобранных генов присутствует важный ген мыши *Сmah* (ENSMUSG00000016756), кодирующий гидроксиллазу цитидин монофосфо-N-ацетилнейраминовой кислоты. Действительно, у людей наблюдается видоспецифический дефицит N-гликолилнейраминовой кислоты, обусловленный псевдогенизацией *СMAH*, произошедшей у предков гоминин 2–3 млн лет назад.

Предложенные метод и программа обеспечивают эффективное предсказание ортологов с учётом геномных структур при одновременном рассмотрении сотен видов.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-13037. Вычисления выполнялись с использованием суперкомпьютеров Межведомственного суперкомпьютерного центра Российской академии наук (МСЦ РАН).

Литература

1. Razin S.V., Gavrilov A.A. *Structural-functional domains of the eukaryotic genome // Biochemistry (Moscow)*. 2018. Vol. 83, no. 4. P. 302–312.

UDC 577.29 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-258-260

GENE LOSS PREDICTION BASED ON GENOMIC STRUCTURE

Rubanov L.I., Shilovsky G.A., Seliverstov A.V., Zverkov O.A., Lyubetsky V.A.

*Institute for Information Transmission Problems of the Russian Academy of Sciences (Kharkevich Institute), Moscow, Russia
Bolshoy Karetny per. 19, build.1, Moscow 127051 Russia
e-mail: lyubetsky@iitp.ru*

We have developed an efficient algorithm implemented in a program for a multiprocessor computing system, which makes it possible to discover genes lost or acquired during the evolution of most species from a given set. The new approach takes into account the mutual arrangement of genes on a chromosome and allows us to simultaneously consider hundreds of species.

Key words: orthologous gene; synteny; gene loss; effective computer program; evaluation of the program's time; supercomputer.

Among the commonly used methods of inferring orthology and paralogy relations are: phylogenetic analysis based on the homologous sequences comparison and tree reconciliation, analysis of local gene arrangement (synteny) and reconstruction of evolutionary scenarios based on genome structures (the global arrangement of genes on chromosomes). It is known that sequence alignment and synteny can lead to inconsistent results. There is an ever growing set of algorithms and tools devoted to orthology analysis and related tasks. The essential feature of our approach to the search for lost or acquired genes is the simultaneous comparison of large sets of species.

The lossgainRSL program was developed to search for genes lost, acquired or preserved in most species from several species sets. The algorithm was implemented as a CLI program providing parallel computing in the MPI environment under Windows and Linux operating systems. The program is freely available at <http://lab6.iitp.ru/en/lossgainrsl/>. The lossgainRSL program has the following scheme. For a selected species, all its genes (each with a fixed-size neighborhood) are considered, which are present in or missing from several pre-defined parts of input sets of species. The condition for the gene selection can be arbitrary and is user defined. It is possible to work with incomplete genomes. The mentioned neighborhood of a gene (defined by a program's parameter) is used to check for synteny within its limits. It is important that the size of the neighborhood can be chosen reasonably. Namely, the 3D structure of DNA includes topologically associated domains (TADs). The TAD size defines the neighborhood and appears biologically sound [1].

The search time for a given gene ortholog in a given neighborhood is comparable to the time it takes to read the input tables of orthologs and paralogs and is bounded by a linear function of the program input length. Consequently, the total running time of the program is bounded by a second-degree polynomial of the input length, even for a single-processor machine. It allows us to simultaneously consider hundreds of species on a multiprocessor system.

Using the program, we have found the mouse genes, which were lost or became pseudogenes in human but are preserved (and have protein products) in no less than four out of five examined apes: *Gorilla gorilla*, *Nomascus leucogenys*, *Pan paniscus*, *Pan troglodytes*, and *Pongo abelii*. Among these genes there is an important mouse gene Cmah (ENSMUSG00000016756) which encodes cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase. Indeed, humans exhibit a species-specific deficiency of the N-glycolylneuraminic acid, due to pseudogenization of *CMAH* which occurred in hominin ancestors 2 to 3 MYA.

The proposed method and program provide an effective prediction of orthologs taking into account genomic structures while examining hundreds of species.

Acknowledgments. The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-29-13037. The research was carried out using supercomputers at the Joint Supercomputer Center of the Russian Academy of Sciences (JSCC RAS).

References

1. Razin S.V., Gavrilov A.A. Structural-functional domains of the eukaryotic genome // *Biochemistry (Moscow)*. 2018. Vol. 83, no. 4. P. 302–312.

УДК 575.83 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-260-262

ЭВОЛЮЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМНЫХ СТРУКТУР У МЕТАЗОА: АЛГОРИТМ И ПРОГРАММА

Горбунов К.Ю., Любецкий В.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук. 127051, г. Москва, Большой Каретный переулок, д.19 стр. 1.
e-mail: lyubetski@iitp.ru

Получен быстрый алгоритм и соответствующая программа для реконструкции геномных структур вдоль филогенетического дерева с произвольно назначаемыми ценами эволюционных событий. В зависимости от размера исходных данных, используются локальные, суперкомпьютерные или облачные вычисления. Программа тестировалась на искусственных данных и затем была применена для реконструкции предковых геномных структур митохондрий животных (Metazoa).

Ключевые слова: реконструкция, геномная структура, митохондрия, эффективный суперкомпьютерный алгоритм.

Рассмотрены геномные структуры (взятые из базы данных RefSeq) митохондрий следующих видов: трихоплакс, пять губок, три гребневика, восемь видов типа Cnidaria (два коралловых полипа, три гидры и три из класса Мухозоа), шесть видов типа Xenacoelomorpha, четыре первичноротых и пять вторичноротых. И для них выполнена реконструкция эволюции с помощью оригинального алгоритма. В структуры отобраны белок-кодирующие гены и гены, кодирующие большие и малую субъединицы митохондриальной рибосомы. Каждая исходная структура содержала от 8 до 16 генов и состояла из одной кольцевой хромосомы, кроме трёх видов с линейными хромосомами: пять у *Clathrina clathrus*, одна у *Hydra oligactis* и две у *Hydra magnipapillata*. Направленный перебор цен показал, что следующий вариант брейкпойнтовых цен оптимален, а также соответствует биологическим представлениям об эволюции митохондрий (см. ниже): цена эволюционного события склейки краёв генов равна 2, цена их расклейки – 1, цена потери гена – 3, цена возникновения гена – 4. Алгоритм основан на следующем методе, обеспечивающем эффективность вычислений. Во внутренних вершинах дерева булевы переменные x (показатель склейки пар краёв генов) и y (показатель отсутствия гена) определяются по их известным значениям в листьях. Это делается динамическим программированием или более сложной оригинальной процедурой. Если ген отсутствует, т.е. $y=1$, склейки его краёв обнуляются, но остаётся возможность склейки одного края с двумя и более краями, что запрещено. Поэтому необходима процедура устанения такого рода «противоречий». В биологическом примере в каждой вершине возможен такой набор склеек, который приводят к одной кольцевой хромосоме. В 15 внутренних вершинах число таких виртуальных хромосом оказалось от двух до пяти. Направленным перебором всех комбинаций таких хромосом искались по кольцевой хромосоме в каждой вершине дерева, так чтобы эти хромосомы в совокупности минимизировали суммарное (по всем рёбрам дерева) расстояние между структурами на концах ребра. В качестве расстояния использовалась кратчайшая длина преобразования одной структуры в другую с ценами эволюционных событий: переклейка – 1, удаление связного участка хромосомы – 1.5, вставка такого участка – 2. Предлагаемая программа (см. <http://lab6.iitp.ru/ru/chromoggl/>) реконструировала все предковые структуры, они показаны на той же веб-странице. Отметим важность выбора цен эволюционных событий. Условие «цена склейки превышает цену расклейки» обеспечило возможность структуры из одной кольцевой хромосомы в каждой вершине дерева. Условие «цена возникновения гена превышает цену его потери» обеспечило, что удалений существенно больше, чем вставок, и большинство удалений расположено ближе к корню. В полученном сценарии эволюции 14 удалений и одна вставка. Условие «цены вставки и удаления связного участка превышают цены переклеек» позволяет соединять удаляемые гены в связный участок до их последующего удаления. Например, в сценарии при переходе от общего предка видов *Kudoa septempunctata* и *Hydra sinensis* к общему предку видов *Kudoa septempunctata* и *Kudoa iwatai* три участка генов, принадлежащих первой вершине, но не второй, сначала объединяются в связный участок, который затем удаляются. Программа обеспечивает выполнение таких общих требований, задаваемых на специальном языке спецификаций, на итоговый сценарий эволюции. Предложен алгоритм и программа вычисления сценария эволюции геномных структур с учётом биологически мотивированных цен и условий на итоговый сценарий. С помощью программы выполнена реконструкция эволюции митохондриальных геномных структур у Metazoa. Реконструкция с помощью быстрой программы позволяет уточнять филогенетическое положение видов.

Благодарность. Исследование выполнено при поддержке РФФИ (№ 18-29-13037).

UDC 575.83 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-260-262

EVOLUTION OF MITOCHONDRIAL GENOMIC STRUCTURES IN METAZOANS: ALGORITHM AND SOFTWARE

Gorbunov K.Yu., Lyubetsky V.A.

Institute for Information Transmission Problems of the Russian Academy of Sciences (Kharkevich Institute), Moscow, Russia

Bolshoy Karetny per. 19, build.1, Moscow 127051 Russia

e-mail: lyubetsk@iitp.ru

A fast algorithm and software for the reconstruction of genomic structures along a phylogenetic tree with specified cost of evolutionary events have been generated. Depending on the data size, local, supercomputer, or cloud computing can be used. The software was tested on synthetic data and then applied to reconstruct the ancestral genomic structures of metazoan mitochondria.

Key words: reconstruction, genomic structure, mitochondria, efficient supercomputer algorithm.

Mitochondrial genomic structures (from RefSeq) of the Trichoplax, five sponges, three ctenophores, eight cnidarians (two anthozoans, three hydras, and three myxozoans), six xenacoelomorphs, four protostomes, and five deuterostomes were considered and the original algorithm was used to reconstruct their evolution. The structures included protein-coding genes and genes coding for the small and large subunits of the mitochondrial ribosome. Each initial structure contained 8 to 16 genes in a single circular chromosome except three species with linear chromosomes; five chromosomes in *Clathrina clathrus*; one in *Hydra oligactis*; and two in *Hydra magnipapillata*. A directional search of the costs has identified the following optimal set corresponding to the biological considerations (see below): the breakpoint gluing gene extremities cost equals 2; the ungluing gene extremities cost, 1; the gene loss cost, 3; and the gene emergence cost, 4. The algorithm rely on the following computation-efficient method. In the internal nodes of the tree, the Boolean variables x (the index of gluing gene extremities) and y (the index of gene absence) are defined from their available values in the leaves. This is performed by dynamic programming or a more complex original procedure. If a gene is missing, i.e., $y=1$, its gluing indices are set to zero but multiple gluings of the same extremity are yet possible, which necessitates a procedure eliminating such problems. In the above biological example, gluings are possible in any node, which results in a single circular chromosome. The number of such possible chromosomes ranged from two to 5 in 15 internal nodes. A directional search of all combinations of all such chromosomes was used to identify single circular chromosomes with the minimum total (for all tree edges) distance between the structures at the edge termini in all nodes. This distance is the shortest sequence of evolutionary events transforming one structure into another using the following costs: cut-and-paste, 1; deletion of the connected region, 1.5; insertion of the connected region, 2. The reconstruction was done using the above mentioned original software. Both the program and reconstruction are available at <http://lab6.iitp.ru/ru/chromoggl/>. Notice the significance of evolutionary event costs. The condition that the gluing cost is greater than the ungluing cost made possible the formation of a single circular chromosome in each node. The condition that the gene emergence cost is greater than the gene loss cost provided that there were much more deletions than insertions and that most of deletions were close to the root. The resulting scenario included 14 deletions and 1 insertion. The condition that the insertion and deletion costs are greater than the cut-and-paste cost allowed the deleted genes to be pooled before their deletion. For instance, in the scenario the transition from the common ancestor of *Kudoa septempunctata* and *Hydra sinensis* to the common ancestor of *Kudoa septempunctata* and *Kudoa iwatai*, three gene regions that belong to the first but not the second node are first pooled and then deleted. The software allows such general evolutionary conditions to be satisfied in the generated scenario. An algorithm and software computing the evolutionary scenario for the genomic structures with an account of biologically motivated costs and conditions were proposed. The software was used to reconstruct the evolution of mitochondrial genomic structures in Metazoans. Such fast computer-aided reconstruction can be used to refine the phylogenetic position of species.

Acknowledgments. This study was funded by Russian Foundation for Basic Research (project no. 18-29-13037).

УДК 573.22 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-262-265

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛАСТЕРОВ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА НЕРИБОСОМНЫХ ПЕПТИДОВ БАКТЕРИЙ НА ОСНОВЕ ПРЕДСКАЗАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

Клименко А.И., Лашин С.А., Афонников Д.А., Матушкин Ю.Г.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск,
Россия, 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева 10
e-mail: mat@bionet.nsc.ru

Обнаружено, что бактерии, имеющие и не имеющие кластеры генов биосинтеза для нерибосомных пептид-синтетаз, существенно различаются по предпочтительным эволюционным стратегиям оптимизации первичной структуры кодирующих частей генов.

Ключевые слова: бактерии, эффективность элонгации трансляции, нерибосомные пептид синтетазы.

Эффективность элонгации трансляции – это характеристика «оптимальности» первичной структуры генов в организме: чем активнее происходит экспрессия указанных генов, тем выше индекс эффективности элонгации (ИЭЭ) [1]. Оптимизация может проходить по частотам используемых кодонов, минимизации

количества и «прочности» потенциальных шпилек на мРНК и комбинации этих параметров. Нерибосомные пептиды (НРП) составляют важную часть бактериальных пептидов, действующих в качестве антибиотиков, токсинов, поверхностно-активных веществ, сидерофоров, противоопухолевых агентов и модификаторов иммунного ответа [2]. Биосинтез НРП не нуждается в мРНК и зависит от конкретных ферментов – нерибосомных пептидсинтетаз (НРПС), которые обычно объединены в кластеры генов биосинтеза (КГБ) в бактериальных геномах [3]. Мы рассчитали ИЭЭ для генов, кодирующих нерибосомные пептидсинтетазы, используя комплекс программ EloE [4]. Были проанализированы 2249 геномов бактерий, содержащих 5676 кластеров НРПС.

Результаты анализа методом главных компонент с учётом композиционности данных (Рис. 1) показывают, что группы организмов, выделенные по признаку наличия/отсутствия НРП хорошо разделяются, причём основной вклад в дисперсию вносят доли геномов, оптимизированных по ИЭЭ2 (минимизируется количество потенциальных шпилек на мРНК) и ИЭЭ5 (оптимизируется частотно-кодонный состав, минимизируется количество и «прочность» потенциальных шпилек на мРНК).

Из Рис. 1 видно, что классы геномов организмов, обладающих КГБ НРПС и не обладающих ими, различаются преимущественно долями геномов, относящихся к типу ИЭЭ5 (для НРП-содержащих) и ИЭЭ2 (для не содержащих НРП). Т.е. приобретение способности синтезировать нерибосомные пептиды сопровождается увеличением доли геномов, оптимизирующих процесс элонгации трансляции генов: с учётом как частот кодонов, так и минимизации количества и «прочности» шпилек. По-видимому, это происходит, поскольку синтез нерибосомных пептидов несёт дополнительные энергетические издержки для бактерий, что приводит к необходимости оптимизировать процесс трансляции по всем 3 параметрам для данной группы бактерий.

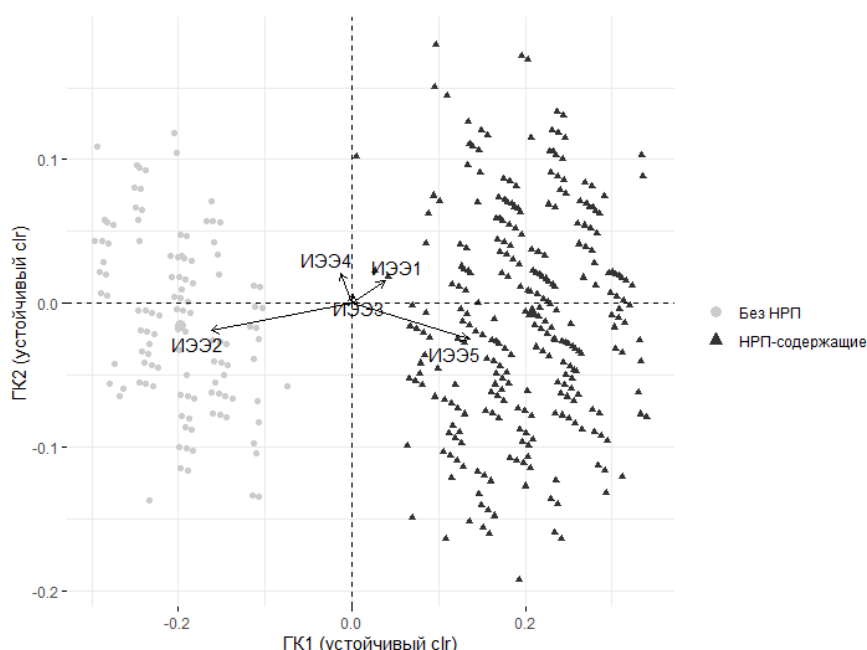


Рис. 1. Результаты анализа методом главных компонент для композиционных данных [5] множества композиций по типам ИЭЭ, полученного в результате ресэмплинга.

Серыми кружочками отмечены случайные выборки геномов из родов, принадлежащих к группе геномов, НЕ содержащих КГБ НРПС, а чёрными треугольниками отмечены случайные выборки геномов из родов, принадлежащих к группе геномов, содержащих КГБ НРПС.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-00-00462/17-00-00470 (К).

Литература

1. Likhoshvai V.A. Matushkin Yu.G. Differentiation of single-cell organisms according to elongation stages crucial for gene expression efficacy // *FEBS Letters*. 2002. Vol. 516. P.87-92.
2. Caboche S. et al. NORINE: A database of nonribosomal peptides // *Nucleic Acids Res*. 2008. Vol. 36, № SUPPL. 1. P. 326–331.

3. Süssmuth R.D., Mainz A. *Nonribosomal Peptide Synthesis—Principles and Prospects* // *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2017. Vol. 56, № 14. P. 3770–3821.
4. Sokolov V. S., Zuraev B. S., Lashin S. A., Matushkin Yu. G. *EloE: Web application for estimation of gene translation elongation efficiency* // *Russian Journal of Genetics: Applied Research.* July 2015. Vol. 5. Issue 4. P 335-339.
5. Filzmoser P., Hron K., Reimann C. *Principal component analysis for compositional data with outliers* // *Environmetrics.* 2007. Vol. 20, № 6. P. 621–632.

UDC 573.22 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-262-265

BIOINFORMATIC ANALYSIS OF BIOSYNTHETIC GENE CLUSTERS OF NONRIBOSOMAL PEPTIDES IN BACTERIA BASED ON PREDICTION OF GENE TRANSLATION ELONGATION EFFICIENCY

A.I. Klimenko, S.A. Lashin, D.A. Afonnikov, Yu.G. Matushkin

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Russia, 630090, Novosibirsk, Lavrentiev ave. 10
 e-mail: mat@bionet.nsc.ru

We have found out that those two classes of bacteria whose genomes contain and do not contain biosynthetic gene clusters of nonribosomal peptide synthetases substantially differentiate in preferred evolutionary strategies for optimizing primary structure of their gene coding sequences.

Key words: bacteria, translation elongation efficiency, nonribosomal peptide synthetases.

Gene translation elongation efficiency is an indicator of primary gene structure optimality in the organism: the more active is their expression, the higher is elongation efficiency index (EEI) [1]. There is a number of ways that such an optimization can follow: honing codon usage frequencies, minimizing number and stability of mRNA hairpins and combination of these parameters. Nonribosomal peptides (NRPs) constitute an important fraction of bacterial peptidomes acting as antibiotics, toxins, surfactants, siderophores, anti-tumor agents and immune response modifiers [2]. Biosynthesis of NRPs is dependent on particular enzymes - nonribosomal peptide synthetases (NRPSes), which are encoded by biosynthetic gene clusters (BGCs) in bacterial genomes [3]. We have calculated EEI for the genes that are part of NRPS BGCs using EloE software [4]. We have analyzed 2249 bacterial genomes containing 5676 NRPS clusters.

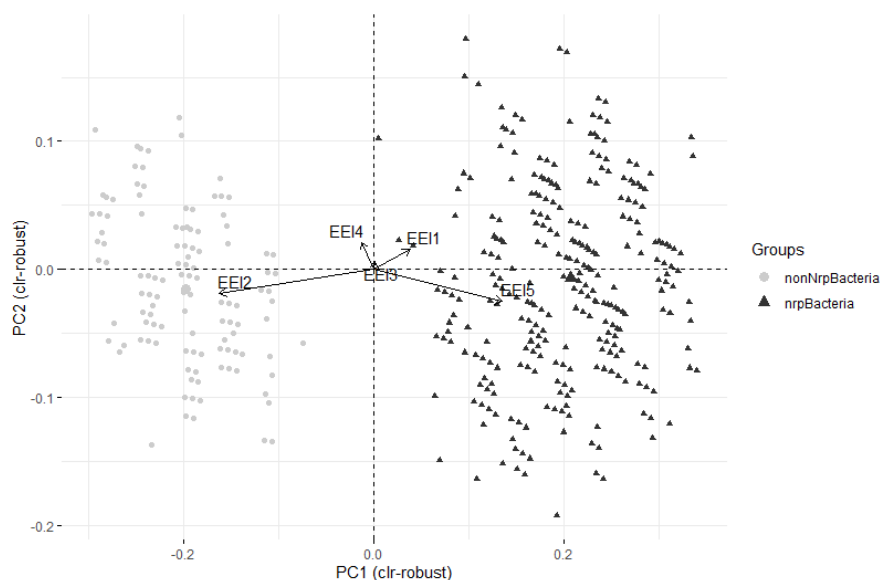


Fig. 1. The results of principal component analysis for compositional data [5] for the EEI type composition set obtained through resampling. Gray circles denote random samples of genomes belonging to those genera that belong to the group of non-NRP-containing genomes whereas black triangles denote random samples of genomes belonging to the genera that belong to the group of NRP-containing genomes.

The results of statistical analysis using principal component analysis (PCA) for compositional data (Fig. 1) demonstrate that groups of organisms categorized by presence/absence of NRPs are clearly distinguished and the highest PCA loadings correspond to the fractions of genomes optimized for EEI2 (minimization of mRNA hairpin number) and EEI5 (optimization of codon frequencies, minimization of number and stability of mRNA hairpins).

Fig. 1 shows that those classes of genomes who possess NRPS BGCs differentiate from those who do not, predominantly, in the fractions of genomes belonging to the EEI5 type (which is high in NRP-containing bacteria) and EEI2 (which is high in non-NRP-containing bacteria). This fact suggests the following interpretation: acquiring a capacity to synthesize nonribosomal peptides is accompanied with an increase in the fraction of genomes optimizing their gene translation elongation based on both changing codon frequencies and minimizing number and stability of mRNA hairpins. We argue that NRP-containing bacteria seem to incur additional energetic maintenance costs due to the nonribosomal peptide synthesis and it results in an urge to optimize the gene translation elongation engaging all the three parameters in that group of bacteria.

This study was funded by the Russian Foundation for Basic Research (Grant Nos. 17-00-00462/17-00-00470 (K)).

References

1. Likhoshvai V.A., Matushkin Yu.G. Differentiation of single-cell organisms according to elongation stages crucial for gene expression efficacy // *FEBS Letters*. 2002. Vol. 516. P.87-92.
2. Caboche S. et al. NORINE: A database of nonribosomal peptides // *Nucleic Acids Res*. 2008. Vol. 36, № SUPPL. 1. P. 326–331.
3. Süßmuth R.D., Mainz A. Nonribosomal Peptide Synthesis—Principles and Prospects // *Angew. Chemie - Int. Ed*. 2017. Vol. 56, № 14. P. 3770–3821.
4. Sokolov V. S., Zuraev B. S., Lashin S. A., Matushkin Yu. G. EloE: Web application for estimation of gene translation elongation efficiency // *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. July 2015. Vol. 5. Issue 4. P. 335-339.
5. Filzmoser P., Hron K., Reimann C. Principal component analysis for compositional data with outliers // *Environmetrics*. 2007. Vol. 20, № 6. P. 621–632.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-265-267

САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ miRNA В mRNA КАНДИДАТНЫХ ГЕНОВ БИПОЛЯРНОГО РАССТРОЙСТВА ЧЕЛОВЕКА

Пинский И. В.

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Республика Казахстан
050040, Алматы, проспект аль-Фараби, 71
e-mail: ilya.pinskyi@mail.ru

Было обнаружено, что 29 генов человека, связанных с биполярным расстройством, имеют 153 сайта связывания для 113 miRNA с уровнем комплементарности, равным 90% и более. Полученные результаты могут быть использованы для разработки будущих методов ранней диагностики психических заболеваний человека, основанных на miRNA и их генах-мишенях.

Ключевые слова: miRNA; mRNA; кандидатные гены; биполярное расстройство.

Биполярное расстройство (БПР) – это психическое заболевание, проявляющееся повторяющимися фазами мании, депрессии и эутимии в поведении человека [1]. 29 белок-кодирующих кандидатных генов тесно связаны с развитием этого заболевания [2]. Экспрессия многих белок-кодирующих генов человека на пост-транскрипционном уровне регулируется с помощью miRNAs (microRNA), связывающихся с mRNA этих генов и подавляющих или блокирующих их трансляцию. Экспериментальные исследования показали, что некоторые miRNA регулируют экспрессию генов БПР [3]. Таким образом, было важно найти *in silico* сайты связывания miRNA в mRNA кандидатных генов БПР. Нуклеотидные последовательности mRNA белок-кодирующих генов БПР человека были загружены с сайта NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Нуклеотидные последовательности 2654 «зрелых» miRNA человека были загружены из miRBase (<http://mirbase.org>). Сайты связывания miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA генов были предсказаны с помощью программы miRDB (<http://mirdb.org/>). В результате исследования было найдено, что 29 генов БПР человека имеют 153 сайта связывания для 113 miRNA с уровнем комплементарности, равным или превышающим 90%. Только десять генов (*ZCCHC2*, *FADS2*, *SSBP2*, *STK4*, *CACNA1C*, *ALPK3*, *RPS6KA2*, *NCAN*, *THSD7A* и *PLEKH01*) имеют 14 сайтов связывания для 11 miRNA (miR-3960, miR-1224-3p, miR-1273g-3p, miR-1273f, miR-1281, miR-4456, miR-6852-3p, miR-4441, miR-6726-5p, miR-574-5p и miR-466) с уровнем комплементарности от 95% и более. 16 се-

мейств miRNA имеют по два и более гена-мишени каждое. MiR-1273 (f, g-3p, e(x)) связывается с mRNA генов *SSBP2* и *STK4*. MiR-1281 связывается с mRNA генов *CACNA1C* и *ITIH1*. MiR-6852-3p имеет сайты связывания в mRNA генов *HDAC5*, *RPS6KA2* и *STK4*. MiR-6726 имеет сайты связывания в mRNA генов *FSTL5* и *PLEKH01*. MiR-3960 связывается с mRNA генов *PACS1* и *ZCCHC2*. MiR-619-5p имеет сайты связывания в mRNA генов *ADCY2* и *SSBP2*. MiR-1915-3p связывается с mRNA генов *PACS1* и *ZCCHC2*. MiR-4478 связывается с mRNA генов *NCAN*, *PACS1* и *TRANK1*. MiR-4266 связывается с mRNA генов *ANK3*, *SHANK2* и *ZCCHC2*. Гены *GRIN2A*, *PACS1*, *POU3F2* и *THSD7A* являются мишенями для miR-4258. MiR-574-5p имеет сайты связывания в mRNA генов *THSD7A* и *RIMS1*. MiR-6127 связывается с mRNA генов *SHANK2* и *SSBP2*. MiR-6087 связывается с mRNA генов *PLEKH01*, *RPS6KA2* и *SHANK2*. MiR-1285 имеет сайты связывания в mRNA генов *ADCY2* и *STK4*. MiR-4297 связывается с mRNA генов *CACNA1C* и *SHANK2*. MiR-4497 имеет сайты связывания в mRNA генов *SRPK2* и *ZCCHC2*. Каждый из следующих генов БПР (*ADCY2*, *CACNA1C*, *PACS1*, *PLEKH01*, *RPS6KA2*, *SHANK2*, *SSBP2*, *STK4*, *THSD7A*, *ZCCHC2*) имеет сайты связывания разных miRNA. Таким образом, мы можем наблюдать пересечение множества регуляторных путей между miRNA и генами БПР человека.

Литература

1. Witt S. H., Juraeva D., Sticht C., Strohmaier J., Meier S., Treutlein J., Dukal H., Frank J., Lang M., Deuschle M., Schulze T. G., Degenhardt F., Mattheisen M., Brors B., Cichon S., Nöthen M. M., Witt C. C., Rietschel M. Investigation of manic and euthymic episodes identifies state- and trait-specific gene expression and *STAB1* as a new candidate gene for bipolar disorder//*Transl. Psychiatry*. 2014. Vol. 4:e426.
2. Stahl E. A., et al. Genome-wide association study identifies 30 loci associated with bipolar disorder//*Nat. Genet*. 2019. Vol. 51. № 5. P. 793-803.
3. Gruzdev S. K., Yakovlev A. A., Druzhkova T. A., Guekht A. B., Gulyaeva N. V. The Missing Link: How Exosomes and miRNAs can Help in Bridging Psychiatry and Molecular Biology in the Context of Depression, Bipolar Disorder and Schizophrenia//*Cell Mol. Neurobiol*. 2019. Vol. 39. № 6. P. 729-750.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-265-267

MIRNA BINDING SITES IN MRNAS OF HUMAN BIPOLAR DISORDER GENE CANDIDATES

Pinsky I. V.

Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Republic of Kazakhstan
050040, Almaty, Al-Farabi Avenue, 71
e-mail: ilya.pinskyi@mail.ru

It was found that 29 human genes, connected with bipolar disorder, have 153 binding sites for 113 miRNAs with level of complementarity equal to 90% and more. Obtained results can be used for the development of future early diagnostic methods of human mental diseases based on miRNAs and their gene targets.

Key words: miRNAs; mRNAs; gene candidates; bipolar disorder.

Bipolar disorder (BPD) is a mental disease expressing in repeating maniac, depressive and euthymic phases of human behavior [1]. There are 29 protein-coding gene candidates that are strongly connected with the development of this disease [2]. The expression of many human protein-coding genes is regulated on the post-transcriptional level by miRNAs (microRNAs) binding with mRNAs of the genes and repressing or blocking their translation. Experimental studies showed some miRNA candidates regulating the expression of BPD genes [3]. So it was important to find in silico miRNA binding sites in mRNAs of human bipolar disorder gene candidates. The nucleotide sequences of mRNAs of human protein-coding genes, connected with bipolar disorder, were downloaded from NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Nucleotide sequences of 2654 human mature miRNAs were downloaded from the miRBase (<http://mirbase.org>). miRNA binding sites in the 5'-untranslated regions (5'UTRs), the coding domain sequences (CDSs) and the 3'-untranslated regions (3'UTRs) of mRNAs of genes were predicted by miRDB program (<http://mirdb.org/>). As a result of the study it was found that 29 human genes of bipolar disorder have 153 binding sites for 113 miRNAs with level of complementarity equal to 90% and more. Only ten genes (*ZCCHC2*, *FADS2*, *SSBP2*, *STK4*, *CACNA1C*, *ALPK3*, *RPS6KA2*, *NCAN*, *THSD7A* and *PLEKH01*) have fourteen binding sites for eleven miRNAs (miR-3960, miR-1224-3p, miR-1273g-3p, miR-1273f, miR-1281, miR-4456, miR-6852-3p, miR-4441, miR-6726-5p, miR-574-5p and miR-466) with level of complementarity equal to 95% and more. 16 miRNA families have two and more gene targets each. MiR-1273 (f, g-3p, e(x)) bind with mRNAs of *SSBP2* and *STK4* genes. MiR-1281 binds with mRNAs of *CACNA1C* and *ITIH1* genes. MiR-6852-3p has binding sites in mRNAs of *HDAC5*, *RPS6KA2* and

STK4 genes. MiR-6726 has binding sites in mRNAs of *FSTL5* and *PLEKH01* genes. MiR-3960 binds with mRNAs of *PACS1* and *ZCCHC2* genes. MiR-619-5p has binding sites in mRNAs of *ADCY2* and *SSBP2* genes. MiR-1915-3p binds with mRNAs of *PACS1* and *ZCCHC2* genes. MiR-4478 binds with mRNAs of *NCAN*, *PACS1* and *TRANK1* genes. MiR-4266 binds with mRNAs of *ANK3*, *SHANK2* and *ZCCHC2* genes. Four genes (*GRIN2A*, *PACS1*, *POU3F2* and *THSD7A*) are targets for miR-4258. MiR-574-5p has binding sites with mRNAs of *THSD7A* and *RIMS1* genes. MiR-6127 binds with mRNAs of *SHANK2* and *SSBP2* genes. MiR-6087 binds with mRNAs of three genes: *PLEKH01*, *RPS6KA2* and *SHANK2* genes. MiR-1285 has binding sites in mRNAs of *ADCY2* and *STK4* genes. MiR-4297 binds with mRNAs of *CACNA1C* and *SHANK2* genes. MiR-4497 has binding sites in mRNAs of *SRPK2* and *ZCCHC2* genes. Each of the following ten bipolar disorder genes (*ADCY2*, *CACNA1C*, *PACS1*, *PLEKH01*, *RPS6KA2*, *SHANK2*, *SSBP2*, *STK4*, *THSD7A*, *ZCCHC2*) has binding sites for different miRNAs. So, we can observe a lot of crossing regulatory pathways between miRNAs and genes connected with human bipolar disorder.

References

1. Witt S. H., Juraeva D., Sticht C., Strohmaier J., Meier S., Treutlein J., Dukaal H., Frank J., Lang M., Deuschle M., Schulze T. G., Degenhardt F., Mattheisen M., Brors B., Cichon S., Nöthen M. M., Witt C. C., Rietschel M. Investigation of manic and euthymic episodes identifies state- and trait-specific gene expression and *STAB1* as a new candidate gene for bipolar disorder//*Transl. Psychiatry*. 2014. Vol. 4:e426.
2. Stahl E. A., et al. Genome-wide association study identifies 30 loci associated with bipolar disorder//*Nat. Genet*. 2019. Vol. 51. № 5. P. 793-803.
3. Gruzdev S. K., Yakovlev A. A., Druzhkova T. A., Guekht A. B., Gulyaeva N. V. The Missing Link: How Exosomes and miRNAs can Help in Bridging Psychiatry and Molecular Biology in the Context of Depression, Bipolar Disorder and Schizophrenia//*Cell Mol. Neurobiol*. 2019. Vol. 39. № 6. P. 729-750.

УДК 577.212.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-267-269

ПОИСК SINE ПОВТОРОВ В ГЕНОМЕ РИСА

Суворова Ю.М., Камионская А.М., Коротков Е.В.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук
117312 г. Москва, пр-т 60-летия Октября д. 7, корп.1, e-mail: suvorovay@biengi.ac.ru

Представлен новый метод поиска размытых копий SINE повторов в геномных последовательностях. Метод основан на учете корреляции соседних символов, как при построении позиционно-весовой матрицы, так и при проведении сканирования, что позволяет увеличить алфавит и соответственно разрешающую способность метода. С помощью данного метода проведено исследование генома риса. В результате найдены новые копии SINE повторов, не включенные в стандартную аннотацию. Проведена оценка ложных позитивов.

Ключевые слова: SINE; поиск повторов; выравнивания.

Повторы типа SINE (short interspersed elements, короткие диспергированные повторы) происходят из транспозонов и имеют способность перемещаться по геному и создавать новые копии. В геномах млекопитающих эти повторы представлены в большом количестве (в основном семействами Alu и MIR) и хорошо изучены. Однако, в геномах растений найдено достаточно небольшое количество SINE повторов. Известно, что SINE — это довольно древние повторы и они могут очень сильно отличаться от исходной последовательности за счет большого количества мутаций, которые произошли в них после встраивания. И это затрудняет их распознавание стандартными методами поиска подобий.

Разработанный нами метод, основанный на учете корреляций соседних символов, позволяет находить более размытые копии для известного консенсуса. Причем учет корреляция соседних символов производится как на этапе построения позиционно-весовой матрицы, так и на этапе последующего сканирования. Данный подход позволяет замечать размытое подобие вплоть до 3 замен на одну позицию. Ранее аналогичный метод был использован нами для поиска аминокислотных повторов и сдвигов рамки считывания в генах [1, 2].

Для оценки метода мы провели ряд тестов, в которых копии SINE повтора с разной степенью размытия (число замен на одно основание) встраивались в перемешанную последовательность одной из хромосом. Встраивались как полные копии размытого повтора, так и части повтора. Далее, тестовые последовательности были поданы на вход нашей программе и программе RepeatMasker. Оказалось, что при уровне размытия повтора более 0,75 замен на одну позицию, наша программа значительно превосходит RepeatMasker при одинаковом уровне ложных позитивов. Она находит 100% встроенных копий, в то время

как RepeatMasker нашел 65% повторов полной длины и только 29% повторов не полной длины, при этом сами границы повторов были определены не полностью. При уровне замен более 1.0 на одну позицию, RepeatMasker нашел только 10% и 3% случаев, соответственно, в то время как наша программа находит 99% повторов полной длины и 44% частичных копий повторов.

Далее мы применили разработанный метод для поиска новых копий SINE повторов в геноме риса (*Oryza sativa Japonica*). В качестве исходной последовательности был использован повтор OsSN1 из базы данных SINEbase [4] длиной 293 символа, на его основе была создана ПММ и подобраны оптимальные веса за вставку и делецию. С помощью построенной позиционно-весаевой матрицы для повтора просканированы все 12 хромосом генома риса из базы данных Ensembl. В результате сканирования было найдено 1702 копии этого повтора в геноме. Из них 255 приходится на области, которые не были ранее описаны, как повтор (для сравнения использовалась аннотация Ensembl). Уровень ложных позитивов при выбранном пороговом значении составил менее 4%. Для оценки ложных позитивов были использованы перемешанные последовательности хромосом.

Литература

1. Pugacheva, V., Korotkov, A. & Korotkov, E. Search for Latent Periodicity in Amino Acid Sequences with Insertions and Deletions. (BIOSTEC 2016) (2016).
2. Suvorova, Y. M., Korotkova, M. A., Skryabin, K. G. & Korotkov, E. V. Search for potential reading frameshifts in *cds* from *Arabidopsis thaliana* and other genomes // DNA Res. (2018).
3. Vassetzky NS, Kramerov DA. SINEBase: a database and tool for SINE analysis. // Nucleic acids research. 2013 Jan 1;41(D1)

UDK 577.212.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-267-269

DETECTION OF NEW COPIES OF SINE IN THE RICE GENOME

Suvorova Y.M., Kamionskaya A.M., Korotkov E.V.

Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences
117312 Moscow, 60 let Oktjabrja pr-t, 7, bld. 1, e-mail: suvorovay@biengi.ac.ru

We represent here a new method for the detection of new copies of SINE elements. The method is based on the correlation of pairs of symbols. The correlation is used for the construction of a position-specific matrix as well as for the search of new repeat copies using the matrix. This allows us to enlarge the alphabet and to increase the sensitivity of the method. The method was used to study the rice genome. As a result, new copies of SINE repeats that were not included in the standard annotation were found. The number of false positives was evaluated.

Key words: SINE; repeat detection, alignment.

SINE repeats (short interspersed elements) originate from transposons that can move around the genome and create new copies. In mammalian genomes, these repeats are represented in large numbers (mainly by the Alu and MIR families) and are well studied. However, a rather small number of SINE repeats were found in the plant genomes. It is known that SINE are quite ancient repeats. The modern copies can be very different from the original sequence due to the large number of mutations that occurred after the insertion. And this complicates their search by standard similarity-based methods.

Our method is based on the correlation of pairs of bases in a sequence. It allows us to find more distant copies of a known consensus. The correlation of neighboring bases is considered both at the stage of constructing a position-weight matrix, and at the stage of subsequent whole-genome scanning. This approach allows to detect distant similarity up to 3 substitutions per position. We used a similar method to search for amino acid repeats and reading frame shifts in genes [1,2].

To evaluate the method, we constructed a set of test sequences. Copies of the SINE repeat with different level of similarity (the number of substitutions per base) were inserted into the shuffled sequence of one of the chromosomes. Both the full copies of the repeat as well as parts of the repeat were inserted. These test sequences were submitted to the input of our program and the RepeatMasker program. It turned out that with a number of substitutions more than 0.75 per position, our program significantly exceeds RepeatMasker with the same level of false positives. Our method found 100% of the inserted copies. RepeatMasker found 65% of the full-length repeat copies and only 29% of the incomplete length repeats and the borders of the repeats themselves were not correctly determined. With a substitution level more than 1.0 per one position, RepeatMasker found only

10% and 3% of inserted repeats, respectively, while our program detected 99% of full-length repeats and 44% of partial copies of repeat.

Next, we applied the developed method to search for new copies of SINE repeats in the rice genome (*Oryza sativa Japonica*). The OsSN1 repeat sequence from the SINEbase database [3] with a length of 293 was used as the initial sequence. The position-weight matrix was created and optimal weights for insertion and deletion were selected for this sequence. Using the constructed positional weight matrix, all 12 chromosomes of the rice genome from the Ensembl database were scanned. As a result of scanning, 1702 copies of this repeat in the genome were found. Among them 255 cases were not previously described as repeats (the Ensembl annotation was used for comparison). The level of false positives with the selected threshold value was less than 4%. Shuffled chromosome sequences were used to evaluate false positives.

References

1. Pugacheva, V., Korotkov, A. & Korotkov, E. Search for Latent Periodicity in Amino Acid Sequences with Insertions and Deletions. (BIOSTEC 2016) (2016).
2. Suvorova, Y. M., Korotkova, M. A., Skryabin, K. G. & Korotkov, E. V. Search for potential reading frameshifts in *cds* from *Arabidopsis thaliana* and other genomes // *DNA Res.* (2018).
3. Vassetzky N.S., Kramerov D.A. SINEBase: a database and tool for SINE analysis. // *Nucleic acids research.* 2013 Jan 1;41(D1)

БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

BIOCATALYSIS AND TECHNOLOGIES

Руководители

И.Н. Курочкин д.х.н., профессор, директор Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН /
 I.N. Kourochkin professor, doctor of science (Chemistry), director of N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS
 Е.Н. Ефременко профессор, д.б.н., заведующая лабораторией экобиокатализа кафедры химической энзимологии Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова /
 Y.N. Yefremenko professor, doctor of science (Biology), head of laboratory Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University

1. ИНЖИНИРИНГ СТАДИИ БИОСИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ

С ПОМОЩЬЮ MEDUSOMYCES GISEVII SA-12

Будаева В.В., Скиба Е.А., Гладышева Е.К., Шавыркина Н.А., Павлов И.Н., Миронова Г.Ф., Кашеева Е.И.,
 Гисматулина Ю.А., Корчагина А.А., Ситникова А.Е., Голубев Д.С., Шилов А.И., Кузнецов П.С., Сакович Г.В. 272

ENGINEERING OF BIOSYNTHESIS STAGE OF BACTERIAL NANOCELLULOSE

USING MEDUSOMYCES GISEVII SA-12

Budaeva V.V., Skiba E.A., Gladysheva E.K., Shavyrkina N.A., Pavlov I.N., Mironova G.F., Kashcheyeva E.I.,
 Gismatulina Yu.A., Korchagina A.A., Sitnikova A.E., Golubev D.S., Shilov A.I., Kuznetsov P.S., Sakovich G.V. 273

2. АНАЛИЗ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

РЕАКЦИЙ ЭТЕРИФИКАЦИИ В СРЕДЕ ГЕКСАНА

Давлетшина Г.А., Гамаюрова В.С., Воробьев Е.С. 274

ANALYSIS OF KINETIC PARAMETERS OF ENZYMATIC CATALYSIS ESTERIFICATION

REACTIONS IN HEXANE MEDIUM

Davletshina G.A., Gamayurova V.S., Vorobiev E.S. 275

3. ВОЛОКОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИЕ ЗАЩИТНЫЕ ФУНКЦИИ БЛАГОДАРЯ

МЕТАЛЛИЧЕСКИМ ЧАСТИЦАМ И ГИДРОЛИТИЧЕСКИМ ФЕРМЕНТАМ, ВВОДИМЫМ В ИХ СОСТАВ

Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Лягин И.В., Фролов Г.А., Завьялов В.В.,
 Асланлы А.Г., Степанов Н.А., Гореленков В.К. 276

FIBROUS MATERIALS POSSESSING PROTECTIVE PROPERTIES OWING TO METAL PARTICLES

AND HYDROLYTIC ENZYMES INTRODUCED INTO THEM

Efremenko E.N., Zavialova N.V., Lyagin I.V., Frolov G.A., Zavialov V.V., Aslanli A.G., Stepanov N.A., Gorelenkov V.K. 277

4. ЛИЗОЦИМ КАК ФЕРМЕНТ И КАК БЕЛОК-ЛИГАНД. НОВЫЕ АСПЕКТЫ ЕГО ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ

И ПЕРСПЕКТИВЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ.

Левашов П.А., Матолыгина Д.А., Дмитриева О.А., Овчинникова Е.Д., Нелюб В.А.,
 Нуждина А.В., Растрига Н.В., Гасанова Д.А., Смирнов С.А., Еремеев Н.Л., Тишков В.И. 278

LYSOZYME AS AN ENZYME AND AS A PROTEIN-LIGAND. NEW ASPECTS OF ITS PHYSIOLOGICAL ROLE

AND PROSPECTS FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION.

Levashov P.A., Matolygina D.A., Dmitrieva O.A., Ovchinnikova E.D., Nelyub V.A., Nuzhdina A.V.,
 Rastriga N.V., Gasanova D.A., Smirnov S.A., Ereemeev N.L., Tishkov V.I. 279

5. РАЗНООБРАЗИЕ ФЕРМЕНТНЫХ КАТАЛИЗАТОРОВ И МЕХАНИЗМОВ ИХ ДЕЙСТВИЯ В ПРОЦЕССАХ

НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ НЕЙРОТОКСИНОВ

Лягин И.В., Ефременко Е.Н. 280

DIVERSITY OF ENZYME CATALYSTS AND THEIR ACTION MECHANISMS FOR NEUTRALISATION PROCESS OF

ORGANOPHOSPHORUS NEUROTOXINS

Lyagin I.V., Efremenko E.N. 281

6. ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕТЕРОГЕННОГО КАТАЛИЗА ПРИ РАЗРАБОТКЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИ

ЭФФЕКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЕСУЛЬФУРИЗАЦИИ НЕФТЯНЫХ ФРАКЦИЙ

Маслова О.В., Степанов Н.А., Сенько О.В., Гладченко М.А., Гайдамака С.Н., Акопян А.В.,
 Есева Е.А., Лысенко С.В., Анисимов А.В., Ефременко Е.Н. 282

| | |
|--|-----|
| POSSIBILITIES OF APPLICATION OF HETEROGENEOUS CATALYSIS IN THE DEVELOPMENT OF ECOLOGICALLY EFFICIENT TECHNOLOGIES OF DESULFURIZATION OF OIL FRACTIONS Maslova O.V., Stepanov N.A., Senko O.V., Gladchenko M.A., Gaydamaka S.N., Akopyan A.V., Eseva E.A., Lysenko S.V., Anisimov A.V., Efremenko E.N. | 283 |
| 7. ДЕЙСТВИЕ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ НА РАЗЛИЧНЫЕ ВИДЫ КРАХМАЛА В НАТИВНОМ СОСТОЯНИИ Папахин А.А., Бородина З.М. | 284 |
| THE EFFECT OF GLUCOAMYLASE ON VARIOUS TYPES OF STARCH IN THE NATIVE STATE Papakhin A.A., Borodina Z.M. | 285 |
| 8. ВЛИЯНИЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ АКТИВНОСТИ РАЗНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР В ПРОЦЕССЕ НАКОПЛЕНИЯ СВАЛОЧНОГО ГАЗА Сенько О.В., Степанов Н.А., Маслова О.В., Ефременко Е.Н., Перминова И.В. | 286 |
| INFLUENCE OF HUMIC SUBSTANCES ON METABOLIC ACTIVITY OF VARIOUS BACTERIAL CULTURES IN LANDFILL GAS PRODUCTION Senko O.V., Stepanov N.A., Maslova O.V., Efremenko E.N., Perminova I.V. | 287 |
| 9. КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ХИТИНАЗЫ 19 СЕМЕЙСТВА ИЗ D.CAPENSIS Синельников И.Г., Чулкин А. М., Рожкова А. М., Синицын А.П. | 288 |
| CLONING AND EXPRESSION OF CHITINASE 19 FAMILIE FROM D.CAPENSIS Sinelnikov I. G. Chulkin, A. M., Rozhkova A. M., Sinitsyn A.P. | 289 |
| 10. ОСНОВНЫЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СТАДИИ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ ИЗ ЛЕГКОВОЗОБНОВЛЯЕМОГО ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ С ПОМОЩЬЮ СИМБИОТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ MEDUSOMYCES GISEVII SA-12 Скиба Е.А., Будаева В.В., Гладышева Е.К., Шавыркина Н.А., Павлов И.Н., Голубев Д.С., Миронова Г.Ф., Кашеева Е.И., Гисматулина Ю.А., Корчагина А.А., Сакович Г.В. | 290 |
| MAIN TECHNOLOGICAL STAGES OF BACTERIAL CELLULOSE SYNTHESIS FROM EASILY RENEWABLE CELLULOSIC FEEDSTOCKS BY MEDUSOMYCES GISEVII SA-12 SYMBIOTIC CULTURE Skiba E.A., Budaeva V.V., Gladysheva E.K., Shavyrkin N.A., Pavlov I.N., Golubev D.S., Mironova G.F., Kashcheyeva E.I., Gismatulina Yu.A., Korchagina A.A., Sakovich G.V. | 291 |
| 11. БИОКОНВЕРСИЯ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ РАСТЕНИЕВОДСТВА В БИОМЕЛИОРАНТЫ, ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ Смирнова И.Э., Саданов А.К. | 292 |
| BIOCONVERSION OF PLANT CELLULOSE-CONTAINING WASTES TO THE BIOMELIORANTS FOR AGRICULTURE Smirnova I.E., Sadanov A.K. | 293 |
| 12. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЕМОМ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛА ПЧЕЛИНОГО ВОСКА В КАЧЕСТВЕ СТРУКТУРООБРАЗОВАТЕЛЯ ОЛЕОГЕЛЕЙ Р.В.Соболев, В.А.Саркисян, Ю.В.Фролова | 294 |
| PROSPECTS FOR USING BIOTECHNOLOGICAL METHODS TO INCREASE THE POTENTIAL OF BEESWAX AS A STRUCTURAL OLEOGEL WAX R.Sobolev, V.Sarkisyan, Y.Frolova | 295 |
| 13. БИОДЕГРАДАЦИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ПОЧВЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ: БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И НЕРЕШЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ Свиридов А. В., Шушкова Т. В., Эпиктетов Д. О., Тарлачков С. В., Ермакова И. Т., Леонтьевский А. А. | 296 |
| BIODEGRADATION OF PHOSPHORORGANIC POLLUTANTS BY SOIL BACTERIA: BIOCHEMICAL ASPECTS AND UNSOLVED PROBLEMS Sviridov A. V., Shushkova T. V., Epiktetov D. O., Tarlachkov S. V., Ermakova I. T., Leontievsky A. A. | 297 |
| 14. ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ МИКРОМИЦЕТЫ, ПЕРСПЕКТИВНЫЕ В БИОДЕГРАДАЦИИ ОТХОДОВ ЖИВОТНОВОДСТВА Тиморшина С.Н., Попова Е.А., Осмоловский А.А. | 298 |
| PROTEOLYTICALLY ACTIVE MICROMYCETES, PROMISING IN THE BIODEGRADATION OF LIVESTOCK WASTE Timorshina S.N., Popova E.A., Osmolovskiy A.A. | 299 |
| 15. НЕЙРОЭНЗИМОЛОГИЯ. МЕХАНИЗМ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ХОЛИНЕРГИЧЕСКОМ СИНАПСЕ Варфоломеев С.Д., Быков В.И., Цыбенкова С.Б. | 300 |
| NEUROENZYMOLOGY. MECHANISM OF ACETYLCHOLINESTERASE FUNCTIONING IN CHOLINERGIC SYNAPSE Varfolomeev S.D., Bykov V.I., Tsybenova S.B. | 301 |

УДК 579.66 : 663.1 : 577.32 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-272-273

ИНЖИНИРИНГ СТАДИИ БИОСИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ С ПОМОЩЬЮ *MEDUSOMYCES GISEVII SA-12*

Будаева В.В., Скиба Е.А., Гладышева Е.К., Шавыркина Н.А., Павлов И.Н., Миронова Г.Ф., Кашеева Е.И., Гисматулина Ю.А., Корчагина А.А., Ситникова А.Е., Голубев Д.С., Шилов А.И., Кузнецов П.С., Сакович Г.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Бийск, Россия
 659322, Бийск, ул. Социалистическая, 1,
 e-mail: budaeva@ipcet.ru, 32nadina@mail.ru

Впервые исследовано продленное культивирование с отъёмом метаболита и циклическое культивирование бактериальной наноцеллюлозы (БНЦ). Осуществлено масштабирование биосинтеза БНЦ в ёмкости объёмом 440 л, что на сегодняшний день является самым крупным в мировой практике.

Ключевые слова: *Medusomyces gisevii Sa-12*, бактериальная наноцеллюлоза, продленное культивирование, циклическое культивирование, аэрация.

Главной проблемой внедрения БНЦ является её высокая стоимость. Себестоимость может быть снижена за счёт повышения продуктивности продуцентов; поиска дешёвых источников сырья для биосинтеза или за счёт инженерного поиска решений, позволяющих повысить продуктивность БНЦ на стадии биосинтеза [1].

В данном исследовании был поставлен ряд задач: изучение продленного культивирования БНЦ; исследование циклического культивирования; изучение влияния аэрации; масштабирование биосинтеза БНЦ, все процессы выполнены в нестерильных условиях. В мировой литературе из предложенных технических решений описана только аэрация [2].

В качестве продуцента использована симбиотическая культура *Medusomyces gisevii Sa-12*, культивирование во всех случаях проводилось в статических согласно [3]. Культивирование с отъёмом метаболита (БНЦ) было проведено в ёмкостях площадью от 58 см² до 5542 см², при этом увеличение площади не привело к снижению выхода БНЦ. При использовании одной и той же питательной среды получено от 5 до 11 гель-плёнок БНЦ (в зависимости от конфигурации ёмкости для культивирования), при этом суммарная площадь поверхности получаемых образцов увеличивается в 5-11 раз, а суммарная масса образцов снижается в 2-3 раза по сравнению с обычным культивированием [3].

Было изучено циклическое культивирование БНЦ, при этом, культуральная жидкость, полученная в первом цикле культивирования, использовалась как инокулят для второго цикла, а культуральная жидкость, полученная во втором цикле – как инокулят для третьего цикла. При этом объём культуральной жидкости был увеличен от 10 л до 72 л, а площадь культивирования от 3440 см² до 19600 см². Установлено, что циклическое культивирование в нестерильных условиях не приводит к снижению выхода БНЦ по сравнению с нециклическим.

Были изучены два режима аэрации: 3,3 л/мин и 6,3 л/мин. Культивирование проведено в климатической камере Binder-400. Установлено, что при скорости подачи воздуха 6,3 л/мин выход БНЦ увеличивается в 1,3 раза.

Наконец, биосинтез БНЦ был масштабирован в статических условиях (объём ёмкости 440 л, объём питательной среды 260 л, площадь поверхности 29 400 см², коэффициент масштабирования по объёму 1:26 000. Выход БНЦ снизился в 1,4 раз по сравнению с лабораторным при однократном отъёме метаболита и повысился в 1,2 раза при двукратном отъёме метаболита. Насколько нам известно, это самое крупное масштабирование по объёму БНЦ, выполненное на сегодняшний день в мировой практике.

Исследования выполнены при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск, Россия) за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054).

Литература

1. Velásquez-Riaño M., Bojacá V. Production of bacterial cellulose from alternative low-cost substrates // *Cellulose*. 2017. Vol. 24. P. 2677-2698.
2. Wang J., Tavakoli J., Tang Y. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review // *Carbohydr. Polym.* 2019. Vol. 219. P. 63-67.
3. Gladysheva E.K., Skiba E.A., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Study of the Conditions for the Biosynthesis of Bacterial Cellulose by the Producer *Medusomyces gisevii Sa-12* // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018. Vol. 54. P. 179-187.

UDC 579.66 : 663.1 : 577.32 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-272-273

ENGINEERING OF BIOSYNTHESIS STAGE OF BACTERIAL NANOCELLULOSE USING *MEDUSOMYCES GISEVII SA-12*

Budaeva V.V., Skiba E.A., Gladysheva E.K., Shavyrkina N.A., Pavlov I.N., Mironova G.F., Kashcheyeva E.I., Gismatulina Yu.A., Korchagina A.A., Sitnikova A.E., Golubev D.S., Shilov A.I., Kuznetsov P.S., Sakovich G.V.

*Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (IPCET SB RAS), Biysk, Russia
659322, Biysk, Altai Krai, ul. Sotsialisticheskaya 1
e-mail: budaeva@ipcet.ru, 32nadina@mail.ru*

The extended cultivation with metabolite extraction and the cyclic cultivation of bacterial nanocellulose (BNC) have, for the first time, been examined herein. The biosynthesis of BNC has been scaled up in a 440-L vessel, which is currently the largest scale-up in the world practice.

Key words: *Medusomyces gisevii Sa-12*, bacterial nanocellulose, extended cultivation, cyclic cultivation, aeration.

The high cost of bacterial nanocellulose (BNC) is a major problem in practical application of BNC. The prime cost of BNC can be reduced by enhancing the productivity of microbial producers, finding cheap feedstocks for biosynthesis or by finding engineering solutions that allow the BNC productivity to be improved at the biosynthesis stage [1].

The present study set a series of objectives: to examine extended cultivation of BNC, explore cyclic cultivation, investigate the effect of aeration, and scale up the BNC biosynthesis; all these processes were run under non-sterile conditions. The world literature describes only aeration as a suggested engineering solution [2].

The *Medusomyces gisevii Sa-12* symbiotic culture was used herein as a microbial producer, and the cultivation was run under static conditions in all cases, as reported [3]. The cultivation with metabolite extraction (BNC) was performed in vessels having the areas ranging from 58 cm² to 5542 cm², in which case an increase in the area did not decrease the BNC yield. Using the same nutrient medium, we obtained 5 to 11 BNC gel-films (subject to the culture vessel), with the total surface area of the resulting samples increasing by a factor of 5-11 and the total weight of the samples diminishing by a factor of 2-3 as compared to the conventional culture [3].

The cyclic cultivation of BNC was examined, in which case the growth medium derived in the first cycle of culture was used as the inoculum in the second cycle, whereas the growth medium from the second cycle was employed as the inoculum in the third cycle. With that, the culture medium increased its volume from 10 L to 72 L, and the culture area expanded from 3440 cm² to 19600 cm². The cyclic cultivation under non-sterile conditions did not impair the BNC yield versus the non-cyclic.

The two aeration regimes, 3.3 L/min and 6.3 L/min, were tested. The culture was performed in a Binder-400 climate chamber. The air flowrate of 6.3 L/min was found to increase the BNC yield by 1.3 times.

At last, the biosynthesis of BNC was scaled up under static conditions: 440-L vessel, 260 L nutrient medium, 29 400 cm² surface area, and 1:26 000 scale-up ratio by volume. The BNC yield declined by 1.4 times compared to the lab-scale yield when the metabolite was extracted once, but increased by 1.2 times when the metabolite was extracted twice. To the best of our knowledge, this is the largest scale-up of BNC by volume, which has to date been accomplished in the world practice.

The research was performed using instruments provided by the Biysk Regional Center for Shared Use of Scientific Equipment of the SB RAS (IPCET SB RAS, Biysk). The research was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 17-19-01054).

References

1. Velásquez-Riaño M., Bojacá V. Production of bacterial cellulose from alternative low-cost substrates // *Cellulose*. 2017. Vol. 24. P. 2677-2698.
2. Wang J., Tavakoli J., Tang Y. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review // *Carbohydr. Polym.* 2019. Vol. 219. P. 63-67.
3. Gladysheva E.K., Skiba E.A., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Study of the Conditions for the Biosynthesis of Bacterial Cellulose by the Producer *Medusomyces gisevii Sa-12* // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018. Vol. 54. P. 179-187.

УДК 66.097.3-039. DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-274-275

АНАЛИЗ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА РЕАКЦИЙ ЭТЕРИФИКАЦИИ В СРЕДЕ ГЕКСАНА

Давлетшина Г.А., Гамаюрова В.С., Воробьев Е.С.

ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», Казань, Россия
 420015, г. Казань, ул. К. Маркса, д. 68
 e-mail: guzeladgamovna@gmail.com

Проведен расчет и анализ кинетических параметров процесса синтеза сложных эфиров алифатического ряда с использованием биокатализа методом моделирования, позволяющий вычислять скорости реакций, подбирая различные схемы их протекания.

Ключевые слова: ферментативный катализ, сложный эфир, этерификация, кинетика.

Для расчета и анализа кинетических параметров процесса синтеза сложных эфиров алифатического ряда с использованием биокатализа использовался модифицированный метод Рунге-Кутты-Мерсона, который позволяет решать системы дифференциальных уравнений с подбором шага и с заданной точностью. В качестве доноров ацильных групп использованы кислоты ряда C_3-C_8 и акцепторов – спирты ряда C_4-C_{11} , биокатализаторы – неиммобилизованные ферменты Lipozyme CALB и панкреатическая липаза. Поиск неизвестных констант скоростей реакций проводился средствами оптимизации в надстройке MS Excel «Поиск решения». Для решения задачи были использованы две схемы химических реакций. В первом случае - это реакция этерификации, которая обратима и протекает в данном случае под воздействием ферментов. Соответственно, система уравнений включает два процесса: реакция этерификации (константа скорости $K(1)$), и обратная реакция гидролиза (константа скорости $K(2)$). Во втором случае система уравнений включает три процесса: первичная этерификация (константа скорости $K(1)$), вторичная этерификация, условно названная «автокаталитическая» ($K(2)$) и гидролиз образовавшегося эфира ($K(3)$). Подбор неизвестных констант скоростей реакций проводился с использованием метода наименьших квадратов в надстройке Excel «Поиск решения». Анализ этих данных показывает, что хорошая сходимость расчетных и экспериментальных данных наблюдается при учете всех трех процессов: этерификации, гидролиза и автокатализа, протекающего при включении вновь образованной воды в ферментную систему. Суммарная скорость реакции определяется как:

$$V = K1 + K2 - K3$$

Полученные результаты неожиданны и показывают, что в активном центре фермента кроме процессов этерификации и гидролиза, протекает еще процесс включения воды, образованной в результате этерификации, в гидратную оболочку фермента. Известно, что гидратная оболочка в активном центре необходима для обеспечения нативной конформации фермента, поскольку она обеспечивает сложный комплекс водородных связей, электростатического и гидрофобного взаимодействий. Утрата гидратной оболочки ведет к потере каталитических свойств фермента. Этот процесс условно назван нами «автокатализ», поскольку он обеспечивает сохранение ферментативной активности и продолжение синтеза эфиров.

Литература

1. Коробов В.И., Очков В.Ф. Химическая кинетика: введение с Mathcad/Maple/MCS. М.: Горячая линия – Телеком, 2009. - 384 с.
2. Ерандаева Ю. В., Воробьев Е. С., Воробьева Ф. И. Расчет скорости химических реакций в Excel // Вестник Казан. технологич. ун-та - 2011. - № 11. - С. 88-91.
3. Gamayurova V.S., Mataz J. Jamai, Chernykh M.N., Zaripova S.K. The Influence of Acyl Donators on The Enzymatic Activity of Lipase Lipozyme CALB in The Esterification Process // Journ. of Adv. Chem. Sci. 2017. Vol. 3. Iss. 2. P. 478 - 479.
4. Гамаюрова В. С., Черных М. Н. Энзиматический синтез бензилпропионата // Технологическое оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы Всеросс. науч.-практич. конф. студ., асп. и мол. уч. с междунар. участ. (Бийск, 18-20 мая 2016 г.). – Бийск, 2016. - С. 289-290.
5. Gamayurova V.S., Shnaider K.L., Zaripova S.K., Mataz J. Jamai. Enzymatic synthesis of fatty esters by lipase from porcine pancreas // Journ. of Thermodyn. & Catal. 2016. Vol.7. №1. P. 161-162. doi: 10.4172/2157-7544.1000161.

УДК 66.097.3-039. DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-274-275

ANALYSIS OF KINETIC PARAMETERS OF ENZYMATIC CATALYSIS ESTERIFICATION REACTIONS IN HEXANE MEDIUM

Davletshina G.A., Gamayurova V.S., Vorobiev E.S.

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia
420015, Russian Federation, Kazan, Karl Marx street, 68,
e-mail: guzeladgamovna@gmail.com

The kinetic parameters of the of aliphatic esters biocatalysis synthesis process are calculated and analyzed using modeling method. It allows to calculate the reaction rates by selecting their flow different patterns.

Key words: enzymatic catalysis, ester, esterification, kinetics.

To calculate and analyze the kinetic parameters of the biocatalytic aliphatic esters synthesis a modified Runge-Kutta-Merson method was used. It allows to solve differential equations systems with step selection and a given accuracy. As donors of acyl groups acids of the C₃-C₈ series and acceptors – alcohols of the C₄-C₁₁ series were used, biocatalysts – non-immobilized Lipozyme CALB enzymes and pancreatic lipase and hexane medium were used. Search for unknown constants of reaction rates was performed by optimization tools in the MS Excel add-in "Solution search". To solve the problem two chemical reaction schemes were used. In the first case, it is an esterification reaction, which is reversible and proceeds in this case under the enzymes influence. Accordingly, the system of equations includes two processes: the esterification reaction (rate constant K (1), and the reverse hydrolysis reaction (rate constant K(2)). In the second case, the equations system includes three processes: primary esterification (speed constant K (1)), secondary esterification, conventionally called "autocatalytic" (K(2)), and the resulting ether hydrolysis (K(3)). The unknown constants of reaction rates selection was performed using the least squares method in the Excel add-in "Solution search". The analysis of these data shows that the calculated and experimental data good convergence is observed when all three processes are taken into account: esterification, hydrolysis, and autocatalysis, which occurs when the newly formed water is included in the enzyme system. The total reaction rate is defined as:

$$V = K1 + K2 - K3$$

The obtained results are unexpected and show that in the enzyme active center the process of including water are occur. It formed as a esterification result into the enzyme hydrate shell also proceeds in addition to the processes of esterification and hydrolysis. The obtained results are unexpected and show that in addition to the processes of esterification and hydrolysis in the enzyme active center the including water into the hydrate shell of the enzyme process occur. The water as a result of esterification formed.

It is known that the hydrate shell in the active center is necessary to ensure the enzyme native conformation because it provides a complex of hydrogen bonds, electrostatic and hydrophobic interactions. Loss of the hydrate shell leads to loss of the enzyme catalytic properties. This process we conventionally called "autocatalysis", because it ensures the enzymatic activity preservation and the esters synthesis continuation.

References

1. Korobov V.I., Ochkov V.F. *Himicheskaya kinetika: vvedenie s Mathcad/Maple/MCS. M.: Goryachaya liniya – Telekom, 2009. - 384 s.*
2. Erandaeva YU. V., Vorob'ev E. S., Vorob'eva F. I. *Raschet skorosti himicheskikh reakcij v Excel // Vestnik Kazan. tekhnologich. un-ta - 2011. - №. 11. – S. 88-91.*
3. Gamayurova V.S., Mataz J. Jamai, Chernykh M.N., Zaripova S.K. *The Influence of Acyl Donators on The Enzymatic Activity of Lipase Lipozyme CALB In The Esterification Process // Journ. of Adv. Chem. Scien. 2017. Vol. 3. Iss. 2. P. 478 - 479.*
4. Gamayurova V. S., Chernykh M. N. *Enzimaticeskij sintez benzilpropionata // Tekhnologicheskoe oborudovanie himicheskoy, biotekhnologicheskoy i pishchevoj promyshlennosti: materialy Vseross. nauch.-praktich. konf. stud., asp. i mol. uch. s mezhdunar. uchast. (Bijsk, 18-20 maya 2016 g.). – Bijsk, 2016. - S. 289-290.*
5. Gamayurova V.S., Shnaider K.L., Zaripova S.K., Mataz J. Jamai. *Enzymatic synthesis of fatty esters by lipase from porcine pancreas // Journ. of Thermodyn. & Catal. 2016. Vol.7. №1. P. 161-162. doi: 10.4172/2157-7544.1000161.*

УДК 623.459; 504.054 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-276-278

ВОЛОКОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИЕ ЗАЩИТНЫЕ ФУНКЦИИ БЛАГОДАРЯ МЕТАЛЛИЧЕСКИМ ЧАСТИЦАМ И ГИДРОЛИТИЧЕСКИМ ФЕРМЕНТАМ, ВВОДИМЫМ В ИХ СОСТАВ

Ефременко Е.Н.^{1,2,3}, Завьялова Н.В.⁴, Лягин И.В.^{1,2}, Фролов Г.А.⁵, Завьялов В.В.⁴, Асланлы А.Г.¹, Степанов Н.А.^{1,2}, Гореленков В.К.⁶

¹ МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/3

² Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, РАН, Москва, Россия

³ Институт физико-химических основ функционирования сетей нейронов и искусственного интеллекта МГУ, Москва, Россия

⁴ 27 НЦ МО РФ, Москва, Россия

⁵ Институт стали и сплавов, Москва, Россия

⁶ НИИ эластомерных материалов и изделий, Москва, Россия

e-mail: elena_efremenko@list.ru

Исследование направлено на разработку новых видов композитных волокнистых материалов, обеспечивающих химико-биологическую защиту за счет вводимых в них металлических наночастиц и/или ферментных биокатализаторов.

Ключевые слова: композитные волокнистые материалы, металлические наночастицы, гидролитические ферменты, химико-биологическая защита

В настоящее время огромен научно-практический интерес к композитным материалам, обладающим защитными свойствами, которые в свою очередь обеспечиваются введением в их состав компонентов с антимикробной активностью и противохимическим эффектом. При этом такой эффект может достигаться за счет использования наночастиц различных металлов, в том числе металлоорганических конструкций, или элементов с ферментативным гидролитическим воздействием на разные токсиканты (фосфорорганические соединения и микотоксины, обладающие нейро-, гепато- и нефротоксичным действием), в качестве основных компонентов материалов для химико-биологической защиты. Наличие у композиционных материалов таких характеристик позволяет их считать не только защитными, но и самодезинфицирующимися или самоочищающимися [1].

Разработаны новые материалы с заданными свойствами, скомпонованные в пакеты при соблюдении принципа распределения защитных характеристик от поражающих факторов химического и биологического происхождения по слоям, которые могут быть использованы: – для изготовления защитной фильтрующей одежды постоянного ношения (без использования изолирующих костюмов), а также респираторов типа «лепесток» и лицевых масок; – в качестве фильтрующе-сорбирующих подкладок или нижних костюмов при ношении защитной одежды изолирующего типа; – для замены угольной шихты и противоаэрозольных фильтров, применяемых для внутреннего наполнения (в том числе с применением сменно-картриджного принципа) в фильтрующе-поглощающих коробках и системах противогазов и респираторов, а также в фильтрующе-поглощающих системах установок по очистке воздуха в помещениях; – для изготовления защитных накидок, фартуков, рукавиц, бахил, а также салфеток для экстренного сбора агрессивных жидкостей в случае их аварийного разлива.

Варьирование состава разработанных материалов (типа волокон [2], металлических наночастиц, ферментов [3,4], способов и условий их введения в материал) предопределяет эффективность их действия в отношении разных бактериальных патогенов (грамположительных и грамотрицательных клеток) и химических агентов. Установленные в ходе исследований закономерности в получении необходимых свойств композитных материалов позволяют нацеливаться на создание максимально универсальных защитных вариантов.

Работа финансово поддержана РФФИ (грант №18-29-17069).

Литература

1. Zavialov V.V., Kujelko S.V., Zavialova N.V., Kovtun V.A., Kholstov V.I., Taranchenko Yu.F., Slastilova L.M., Efremenko E.N., Sin'keliov A.P. Modern directions of creating new protective materials and tissues for means of individual and collective protection against toxic chemicals and pathogenic microorganisms. // *Journal of NBC Protection Corps.* - 2019. - V. 3. - № 3. - P. 217–254.

2. Aslanli A., Stepanov N., Razheva T., Podorozhko E., Lyagin I., Lozinsky V., Efremenko E. Enzymatically functionalized composite materials based on nanocellulose and poly(vinyl alcohol) cryogel and possessing antimicrobial activity.// *Materials*. - 2019. - V.12. - № 21. - P.3619.
3. *Organophosphorus neurotoxins: monograph.*// Eds. S.D. Varfolomeev & E.N. Efremenko, Moscow: RIOR. - 2020. - 380 p.
4. Lyagin I., Efremenko E. Enzymes for detoxification of various mycotoxins: origins and mechanisms of catalytic action.// *Molecules*. - 2019. - V.24. - № 13. - e2362.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-276-278

FIBROUS MATERIALS POSSESING PROTECTIVE PROPERTIES OWING TO METAL PARTICLES AND HYDROLYTIC ENZYMES INTRODUCED INTO THEM

Efremenko E.N.^{1,2,3}, Zavialova N.V.⁴, Lyagin I.V.^{1,2}, Frolov G.A.⁵, Zavialov V.V.⁴, Aslanli A.G.¹, Stepanov N.A.^{1,2}, Gorelenkov V.K.⁶

¹ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, RAS, Moscow, Russia

³ Institute of Physicochemical Fundamentals of the Functioning of Neuron Networks and Artificial Intelligence MSU, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Russia

⁴ Budgetary Establishment 27 Scientific Centre of the Ministry of Defense, Moscow, Russia

⁵ Institute of Steel and Alloys, Moscow, Russia

⁶ Scientific Research Institute of Elastomeric Materials and Products, Moscow, Russia
e-mail: elena_efremenko@list.ru

The study is aimed at developing new types of composite fibrous materials that provide chemical and biological protection due to the introduction of metal nanoparticles and/ or enzymatic biocatalysts into them.

Key words: composite fibrous materials, metal nanoparticles, hydrolytic enzymes, chemical and biological protection

At present, there is great scientific and practical interest in composite materials with protective properties, which in turn are ensured by the introduction of components with antimicrobial activity and anti-chemical effect. Moreover, this effect can be achieved by using nanoparticles of various metals, including organometallic constructs, or elements with enzymatic hydrolytic effects on various toxicants (organophosphorus compounds and mycotoxins with neuro-, hepato- and nephrotoxic action), as the main components of materials for chemical and biological protection. The presence of such characteristics in composite materials allows them to be considered not only protective, but also self-disinfecting or self-cleaning [1].

New materials with desired properties have been developed, packaged in compliance with the principle of the distribution of protective characteristics from damaging factors of chemical and biological origin in layers that can be used:

- for the manufacturing of protective filtering clothing of constant wear (without the use of insulating suits), as well as respirators of the "petal" type and face masks;
- as filter-sorbing linings or lower suits when wearing protective clothing of an insulating type;
- to replace the coal charge and aerosol filters used for internal filling (including using the cartridge principle) in filtering and absorbing boxes and gas mask and respirator systems, as well as in filtering and absorbing systems of indoor air purification plants;
- for the manufacturing of protective wraps, aprons, mittens, shoe covers, as well as napkins for emergency collection of aggressive liquids in case of spillage.

Varying the composition of the developed materials (such as fibers [2], metal nanoparticles, enzymes [3,4], methods and conditions for their introduction into the material) determines the effectiveness of their action against various bacterial pathogens (gram-positive and gram-negative cells) and chemical agents. The patterns established in the course of research in obtaining the necessary properties of composite materials allow us to aim at creating the most universal protective options.

This research was financially supported by the RFBR (Grant No.18-29-17069).

References

1. Zavialov V.V., Kujelko S.V., Zavialova N.V., Kovtun V.A., Kholstov V.I., Taranchenko Yu.F., Slastilova L.M., Efremenko E.N., Sin'kelov A.P. Modern directions of creating new protective materials and tissues for means of individual and collective protection against toxic chemicals and pathogenic microorganisms.// *Journal of NBC Protection Corps*. - 2019. - V. 3. - № 3. - P. 217–254.

2. Aslanli A., Stepanov N., Razheva T., Podorozhko E., Lyagin I., Lozinsky V., Efremenko E. Enzymatically functionalized composite materials based on nanocellulose and poly(vinyl alcohol) cryogel and possessing antimicrobial activity.// *Materials*. - 2019. - V.12. - № 21. - P.3619.
3. *Organophosphorus neurotoxins: monograph.*// Eds. S.D. Varfolomeev & E.N. Efremenko, Moscow: RIOR. - 2020. - 380 p.
4. Lyagin I., Efremenko E. Enzymes for detoxification of various mycotoxins: origins and mechanisms of catalytic action.// *Molecules*. - 2019. - V.24. - № 13. - e2362.

УДК 616.157-078 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-278-280

ЛИЗОЦИМ КАК ФЕРМЕНТ И КАК БЕЛОК-ЛИГАНД. НОВЫЕ АСПЕКТЫ ЕГО ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ И ПЕРСПЕКТИВЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ.

Левашов П.А.^{1,2}, Матолыгина Д.А.^{1,2}, Дмитриева О.А.³, Овчинникова Е.Д.³, Нелюб В.А.², Нуждина А.В.², Растрига Н.В.¹, Гасанова Д.А.¹, Смирнов С.А.^{1,2}, Еремеев Н.Л.¹, Тишков В.И.¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Ленинские горы, д.1 стр.3, 119234 Москва, Россия;

e-mail: levashov@yahoo.com

² Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана, Межотраслевой инженеринговый центр композиционных материалов, Москва, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, Институт экспериментальной кардиологии, Москва, Россия

Активность лизоцима в отношении разных бактерий может существенно зависеть от присутствия в растворе глицина и заряженных аминокислот. Сорбент с иммобилизованным лизоцимом эффективно связывает эндотоксин бактерий и может применяться при лечении сепсиса. Лизоцим способен связываться с иммуноглобулинами, что объясняет его опсонинные функции.

Ключевые слова: активация лизоцима, глицин, заряженные аминокислоты, иммобилизованный лизоцим, сорбция эндотоксина, сепсис

В последнее время появилось много новых резистентных штаммов бактерий, потому бактериолитические ферменты всё чаще рассматривают как альтернативу антибиотикам. Наиболее известный бактериолитический фермент лизоцим широко используется в медицине в качестве антимикробного агента. Однако информация о влиянии низкомолекулярных веществ на активность лизоцима по отношению к целым бактериальным клеткам весьма ограничена. Нами получены новые данные об активации лизоцима в присутствии глицина и заряженных аминокислот, что не было известно ранее. Кроме того осуществлена ковалентная иммобилизация и химическая модификация лизоцима с целью расширения возможностей практического применения данного фермента. Глицин и основные аминокислоты (гистидин, лизин и аргинин) значительно увеличивают скорость лизиса грамотрицательных клеток *Escherichia coli* в присутствии растворимого лизоцима, но они существенно не влияют на скорость ферментативного лизиса грамположительного микроорганизма *Micrococcus luteus*. Глутамат и аспартат значительно усиливают ферментативный лизис как *E. coli*, так и *M. luteus*. При использовании иммобилизованного лизоцима влияние глицина и заряженных аминокислот на скорость лизиса клеток значительно снижается. Более глубокое понимание влияния аминокислот на активность нативного и иммобилизованного лизоцима важно как для разработки новых материалов для медицинских целей, так и для выяснения деталей взаимодействия лизоцима с бактериальными клетками. Химическую модификацию лизоцима проводили по аминокруппам остатков лизина с использованием бензойного и анисового альдегидов с образованием основания Шиффа, которое затем восстанавливали с помощью NaBH_4 . Химическая модификация одной или двух аминокрупп молекулы белка не препятствует дальнейшей ковалентной иммобилизации лизоцима с использованием оставшихся свободных аминокрупп. Бактериолитическая активность лизоцима сохраняется после химической модификации и последующей ковалентной иммобилизации. На основании того факта, что лизоцим способен связываться с молекулярными структурами поверхности бактериальной клетки, мы предположили, что иммобилизованный лизоцим может адсорбировать липополисахариды бактерий (эндотоксины). Это предположение подтвердилось, эффективная ёмкость удаления эндотоксина *E. coli* составляет 4200-4800 ЕЭ на мл сорбента с иммобилизованным лизоцимом. В результате химической

модификации лизоцима ёмкость сорбента по эндотоксину возрастает на 25-35%. Имобилизованный лизоцим связывает иммуноглобулин G с ёмкостью 7-8 мг на мл сорбента. Обнаруженная у лизоцима способность связываться с иммуноглобулинами открывает новое понимание физиологической роли лизоцима не только как фермента, но и как опсонина, усиливающего реакцию иммунных клеток. Автоклавирование сорбента с иммобилизованным лизоцимом при 121°C в течение 30 мин инактивирует фермент, однако сорбционная ёмкость по эндотоксину при этом возрастает на 15-20%. Имобилизованный лизоцим после автоклавирования приобретает способность сорбировать бактериальные клетки без их разрушения, что может быть серьёзным преимуществом при использовании сорбента в медицинских целях, так как при удалении бактерий без разрушения снижается риск реакции иммунной реакции организма на биополимеры из внутреннего содержимого бактериальной клетки. Пропускание 5 объёмов физиологического раствора с концентрацией клеток *E. coli* 10⁷ КОЕ/мл через 1 объём сорбента приводит к уменьшению концентрации бактериальных клеток на 41-47%. Сорбенты, полученные в этой работе, могут быть использованы для дальнейшей разработки нового медицинского материала для экстракорпорального лечения сепсиса. Предложенная схема модификации и иммобилизации лизоцима может быть использована с различными альдегидами и различными полимерными хроматографическими матрицами для приготовления сорбентов с разнообразными свойствами.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» по теме: «Создание новых медицинских сорбционных материалов для экстракорпоральных методов лечения сепсиса, сочетающих противомикробное действие и способность к сорбции бактериальных токсинов» (шифр заявки 2017-14-576-0053-142, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57417X0181, соглашение № 14.574.21.0181).

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-278-280

LYSOZYME AS AN ENZYME AND AS A PROTEIN-LIGAND. NEW ASPECTS OF ITS PHYSIOLOGICAL ROLE AND PROSPECTS FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION.

Levashov P.A.^{1,2}, Matolygina D.A.^{1,2}, Dmitrieva O.A.³, Ovchinnikova E.D.³, Nelyub V.A.², Nuzhdina A.V.², Rastriga N.V.¹, Gasanova D.A.¹, Smirnov S.A.^{1,2}, Ereemeev N.L.¹, Tishkov V.I.¹

¹ Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Interindustry Engineering Center for Composite Materials, N.E. Bauman Moscow State Technical University, Moscow, Russia

³ Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russia

The effect of lysozyme against various bacteria may depend significantly on the presence of glycine and charged amino acids in the solution. Immobilized lysozyme effectively adsorbs bacterial endotoxin and can be used for the treatment of sepsis. Lysozyme is able to bind to immunoglobulins, which may explain its opsonin functions.

Key words: activation of lysozyme, glycine, charged amino acids, immobilized lysozyme, endotoxin adsorption, sepsis

Recently, because many new resistant strains of bacteria have appeared, bacteriolytic enzymes are increasingly considered as an alternative to antibiotics. The most well-known bacteriolytic enzyme, lysozyme, is widely used in medicine as an antimicrobial agent. However, information about the effect of low molecular weight substances on lysozyme activity in whole bacterial cells is extremely limited. We obtained new data that has not previously been reported about lysozyme activation in the presence of glycine and charged amino acids. In addition, covalent immobilization and chemical modification of lysozyme were completed to expand the range of possible applications of this enzyme. Glycine and basic amino acids (histidine, lysine and arginine) significantly increase the rate of lysis of gram-negative cells of *Escherichia coli* in the presence of soluble lysozyme, but they do not significantly affect the rate of enzymatic lysis of the gram-positive microorganism *Micrococcus luteus*. Glutamate and aspartate significantly enhance the enzymatic lysis of both *E. coli* and *M. luteus*. When using immobilized lysozyme, the effect of glycine and charged amino acids on the rate of cell lysis is significantly reduced. A deeper understanding of the effect of amino acids on the activity of native and immobilized lysozyme is important both for the development of new materials for medical purposes and for elucidating the details of how lysozyme interacts with bacterial cells. The lysozyme amino groups were chemically modified using benzaldehyde and anisaldehyde to form a Schiff base, which was then reduced using NaBH₄. The chemical modification of one or two free amino groups of a protein molecule does not interfere any further with the covalent immobilization of lysozyme using the remaining

free amino groups. The bacteriolytic activity of lysozyme persists after chemical modification and subsequent covalent immobilization. Since lysozyme can bind to the molecular structures on the surface of a bacterial cell, we hypothesized that immobilized lysozyme could adsorb bacterial lipopolysaccharides (endotoxins), which was later confirmed. The effective capacity of *E. coli* endotoxin removal is 4,200–4,800 EU per mL of sorbent with immobilized lysozyme. As a result of the chemical modification of lysozyme, the sorbent capacity for endotoxin increases by 25–35%. Immobilized lysozyme binds immunoglobulin G with a capacity of 7–8 mg per ml of sorbent. The lysozyme ability to bind immunoglobulins offers new insights into the physiological role of lysozyme not only as an enzyme but also as an opsonin, enhancing the response of immune cells. Autoclaving the sorbent with immobilized lysozyme at 121° C for 30 minutes inactivates the enzyme. However, the sorption capacity for endotoxin, conversely, increases by 15–20%. After autoclaving, the immobilized lysozyme acquires the ability to sorb bacterial cells without destroying them, which can provide a serious advantage when using the adsorbent for medical purposes, since removing bacteria without destroying them reduces the risk of the body's immune response to biopolymers from the internal contents of the bacterial cell. Passing 5 volumes of physiological saline with a *E. coli* concentration of 107 CFU/mL through 1 volume of adsorbent leads to a 41–47% reduction in cell concentration. The adsorbents obtained in this investigation can be used for the further development of new medical material for the extracorporeal treatment of sepsis. The proposed scheme for the modification and immobilization of lysozyme can be used with various aldehydes and polymer chromatographic matrices for the preparation of sorbents with various properties.

The work was supported by the Federal Target Program “Research and Development in Priority Areas for the Development of the Russian Science and Technology Complex for 2014-2020”, section “Development of new medical adsorbents for extracorporeal treatment of sepsis with antimicrobial activity and ability to adsorb bacterial toxins” (application code 2017-14-576-0053-142; unique project ID RFMEFI57417X0181; agreement no. 14.574.21.0181).

УДК 577.15::632.95 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-280-282

РАЗНООБРАЗИЕ ФЕРМЕНТНЫХ КАТАЛИЗАТОРОВ И МЕХАНИЗМОВ ИХ ДЕЙСТВИЯ В ПРОЦЕССАХ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ НЕЙРОТОКСИНОВ

Лягин И.В., Ефременко Е.Н.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
 119991, Россия, г.Москва, Ленинские горы, д.1, строение 3, Химический факультет
 e-mail: elena_efremenko@list.ru

Проведён анализ механизмов действия различных ферментов, способных воздействовать на фосфорорганические соединения (ФОС). Накопленные к настоящему времени знания создают все необходимые предпосылки для активного внедрения биокатализаторов в разнообразных областях биотехнологии.

Ключевые слова: активный центр, механизм катализа, гидролазы, оксидоредуктазы, холинэстераза, фосфатаза, органофосфатгидролаза

Фосфорорганические соединения (ФОС) широко вошли в обиход людей в их хозяйственной деятельности [1]. Однако задолго до этого различные ФОС уже использовались живыми организмами в качестве оружия нападения и защиты, в качестве «строительных блоков» для постройки клеток, да и метаболизма, вообще. Всё это было бы невозможно без привлечения обширного арсенала ферментов, имеющих разнообразное строение и разный механизм действия и участвующих в биосинтезе, модификации и разложении ФОС. Эти же ферменты могут применяться как биокатализаторы с теми или иными изменениями для манипуляций с ФОС антропогенного происхождения. Естественная или направленная эволюция таких ферментов не только дала людям инструмент для ликвидации последствий антропогенной деятельности, но и позволила глубже понять биохимические основы механизма действия данных биокатализаторов. В свою очередь, это открывает перед человечеством поистине колоссальные перспективы для проектирования и дизайна абсолютно новых биокаталитических процессов. И хотя в случае ФОС основной акцент в исследованиях был сделан преимущественно на гидролазах, как наиболее простых объектах, на их примере можно проследить за историческим развитием человеческой мысли. В частности, одним из первых тщательно исследованных ферментов, гидролизующих ФОС, была органофосфатгидролаза [2]. Постепенно был накоплен огромный экспериментальный материал, описывающий все промежуточные стадии

превращений субстрата. Затем, основываясь на этом материале и дополняя его, было проведено обширное компьютерное моделирование [3]. В настоящее время механизм действия этого фермента известен настолько хорошо, что позволяет соотносить с ним совершенно другие ферменты и, сравнивая их структурные мотивы, делать вывод, что послужило причиной изменения их каталитических характеристик. И, как отмечалось выше, основываясь на этом, становится возможным создания аналогичных по активности ферментов, например, из функционально далёких предшественников [4]. Тем самым, открываются новые возможности для биотехнологии и биоэкономики.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-14-00061).

Литература

1. *Organophosphorus neurotoxins: monograph.* // Eds. S.D. Varfolomeev & E.N. Efremenko, Moscow: RIOR, 2020. 380 p.
2. Efremenko E., Lyagin I., Votchitseva Y., Sirotkina M., Varfolomeyev S. Polyhistidine-containing organophosphorus hydrolase with outstanding properties. // *Biocatal. Biotransfor.* 2007. Vol. 25. P. 103–108.
3. Bigley A. N., Raushel F. M. Catalytic mechanisms for phosphotriesterases. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. Vol. 1834. P. 443–453.
4. Yang G., Hong N., Baier F., Jackson C. J., Tokuriki N. Conformational Tinkering Drives Evolution of a Promiscuous Activity through Indirect Mutational Effects. // *Biochemistry.* 2016. Vol. 55. P. 4583–4593.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-280-282

DIVERSITY OF ENZYME CATALYSTS AND THEIR ACTION MECHANISMS FOR NEUTRALISATION PROCESS OF ORGANOPHOSPHORUS NEUROTOXINS

Lyagin I.V., Efremenko E.N.

Lomonosov Moscow State University
119991, Russia, Moscow, Lenin Hills 1, building 3, Faculty of Chemistry
e-mail: elena_efremenko@list.ru

The mechanisms of action of various enzymes acting on organophosphorus compounds (OPCs) were analyzed. The knowledge generated to date creates all the necessary prerequisites for the active application of biocatalysts in various fields of biotechnology.

Key words: active center, mechanism of catalysis, hydrolases, oxidoreductases, cholinesterase, phosphatase, organophosphorus hydrolase

Organophosphorus compounds (OPCs) widely become current in the everyday life [1]. However, long before this, various OPCs were already used by living organisms as weapons of attack and defense, as “building blocks” for cells, and indeed metabolism at all. All this would be impossible without involvement of an extensive arsenal of enzymes having a diverse structure and different mechanism of action and participating in the biosynthesis, modification and decomposition of OPCs. The same enzymes with some modification(s) can be used as biocatalysts to treat OPCs of anthropogenic origin. The natural or directed evolution of such enzymes not only gave people a tool to eliminate the effects of anthropogenic activity, but also allowed a deeper understanding of the biochemical foundations of the mechanism of action of these biocatalysts. In turn, this opens up truly enormous prospects for humanity to design and develop completely new biocatalytic processes. Though the main emphasis in research of OPCs was mainly towards hydrolases being the easiest objects, their example can be used to trace the historical development of human thoughts. In particular, organophosphorus hydrolase was the one of the first thoroughly studied enzymes hydrolyzing OPCs [2].

Huge experimental material describing all the intermediate states of substrate transformations was gradually accumulated. Then, extensive computer simulations based on this material and supplementing it, were carried out [3]. At present, the mechanism of action of this enzyme is so well understood that it allows completely different enzymes to reference to it and, comparing their structural motifs, to conclude what caused the change in their catalytic characteristics. And, as noted above, based on this, it becomes possible to create active enzyme analogues, for example, from functionally distant precursors [4]. This opens up new opportunities for biotechnology and bioeconomics.

The work was supported by the Russian Science Foundation (grant 16-14-00061).

References

1. *Organophosphorus neurotoxins: monograph.* // Eds. S.D. Varfolomeev & E.N. Efremenko, Moscow: RIOR, 2020. 380 p.

2. Efremenko E., Lyagin I., Votchitseva Y., Sirotkina M., Varfolomeyev S. Polyhistidine-containing organophosphorus hydrolase with outstanding properties. // *Biocatal. Biotransfor.* 2007. Vol. 25. P. 103–108.
3. Bigley A. N., Raushel F. M. Catalytic mechanisms for phosphotriesterases. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. Vol. 1834. P. 443–453.
3. Yang G., Hong N., Baier F., Jackson C. J., Tokuriki N. Conformational Tinkering Drives Evolution of a Promiscuous Activity through Indirect Mutational Effects. // *Biochemistry.* 2016. Vol. 55. P. 4583–4593.

УДК 66.012; 579.66 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-282-284

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕТЕРОГЕННОГО КАТАЛИЗА ПРИ РАЗРАБОТКЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЭФФЕКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЕСУЛЬФУРИЗАЦИИ НЕФТЯНЫХ ФРАКЦИЙ

**Маслова О.В., Степанов Н.А., Сенько О.В., Гладченко М.А., Гайдамака С.Н., Акопян А.В., Есева Е.А.,
 Лысенко С.В., Анисимов А.В., Ефременко Е.Н.**

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия 119991, Москва,
 Ленинские горы, 1/3
 e-mail: olga.maslova.rabota@gmail.com

В связи с наличием ряда экологических проблем актуальным является разработка и внедрение новых биокаталитических подходов к десульфуризации нефти и нефтепродуктов, а также постепенная трансформация нефтегазового сектора экономики с ориентиром на устойчивое развитие. При этом привлекательным является разработка и комбинированное применение гетерогенных химических и биокаталитических (клетки, ферменты) катализаторов. Такие катализаторы отличаются высокой эффективностью действия, повышенным периодом полезного использования, их можно легко сосредоточить в нужной концентрации в каталитическом процессе, а потом легко отделить от реакционной среды, получив высокие выходы целевых продуктов.

Ключевые слова: гетерогенный катализ; биокатализатор; иммобилизованный консорциум; десульфуризация

Нефтегазовые ресурсы все еще являются основным сырьем для топливной и химической мировой промышленности. При этом в рамках перехода к устойчивому развитию наиболее востребованы отличающиеся низкой экологической нагрузкой технические решения по десульфуризации нефтепродуктов, которые могут обеспечивать не только полноценное извлечение серосодержащих компонентов из очищаемого топлива, но и предусматривают рациональное использование или ресурсосберегающую утилизацию отходов, а также вовлечение в технологические циклы возобновляемого сырья. В рамках многих из реализуемых в настоящее время в промышленных масштабах или разрабатываемых технологических решений, касающихся окислительной или восстановительной десульфуризации (демеркаптамизация, гидроочистка и др.), на разных стадиях продемонстрированы возможности эффективного использования химических и/или биологических гетерогенных катализаторов (ГК). Среди преимуществ ГК следует отметить то, что их можно сосредоточить в нужном количестве на границе раздела фаз, где в ходе извлечения серосодержащих компонентов из нефтяных фракций во многих процессах протекают основные химические реакции. Реализуемый в промышленных масштабах метод химического восстановительного обессеривания (гидроочистка) подразумевает использование разных ГК ($\text{CoO-MoO}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$, $\text{NiO-MoO}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$, $\text{NiO-MoO}_3/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ и др.) и обеспечивает снижение содержания серы на 95-98%, то есть до 300-500 мг/л. Достижение требуемых, согласно относительно недавно введенных экологических нормативных значений по содержанию серы (не более 10 мг/кг), с использованием данной технологии экономически не выгодно. Образующийся сероводород отделяется, и далее через процесс Клауса из него получают коммерческий продукт - серу. Однако перспективным направлением развития зеленой химии является вовлечение ГК в каталитические процессы, в том числе связанные с десульфуризацией нефтяных фракций, биокатализаторов (БК) на основе клеток или ферментов. Важно отметить, что в ходе разработки технических решений в зависимости от поставленной задачи с использованием БК могут быть реализованы, как реакции восстановления, так и реакции окисления с участием серосодержащих соединений. Наибольшее распространение до недавнего времени получил процесс биокаталитического окислительного обессеривания (4S-путь), который несмотря на экологичность в целом характеризуется низкими показателями эффективности конверсии субстратов при больших временных затратах на процесс и ингибировании известных БК промежуточными продуктами.

Продemonстрирована возможность реализации альтернативного экоэффективного гибридного процесса химико-биокаталитического обессеривания углеводородного сырья [1]. На первой стадии с использованием H_2O_2 , муравьиной кислоты и молибдата натрия в оптимизированных условиях достаточно быстро может быть реализован процесс химического окислительного обессеривания разных нефтяных фракций. Полученные и отделенные экстракцией от очищенного топлива окисленные формы серы (сульфоны) далее вместе с отходами возобновляемого сырья успешно подвергаются биоконверсии в метантенке в присутствии специально подобранных под то или иное исходное сырье искусственно сформированных и иммобилизованных консорциумов. Важно, что в ходе реализации данного процесса удается избежать потерь углеродного скелета извлекаемых из топлива в ходе экстракции органических серосодержащих соединений путем их перевода в биогаз. Сера при этом конвертируется в сульфид, который при необходимости может быть источником для извлечения серы. Апробированные экстрагенты могут быть получены из возобновляемого сырья. Очищенное топливо по содержанию серы удовлетворяет экологическому стандарту Euro-5 (не более 10 мг/кг).

Выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант 18-29-05064).

Литература

1. Senko O., Maslova O., Gladchenko M., Gaydamaka S., Akopyan A., Lysenko S., Karakhanov E., Efremenko, E. Prospective approach to the anaerobic bioconversion of benzo- and dibenzothiophene sulfones to sulfide // *Molecules*. – 2019. – V. 24. – №. 9. – P. 1736.

UDC 66.012; 579.66 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-282-284

POSSIBILITIES OF APPLICATION OF HETEROGENEOUS CATALYSIS IN THE DEVELOPMENT OF ECOLOGICALLY EFFICIENT TECHNOLOGIES OF DESULFURIZATION OF OIL FRACTIONS

Maslova O.V., Stepanov N.A., Senko O.V., Gladchenko M.A., Gaydamaka S.N., Akopyan A.V., Eseva E.A., Lysenko S.V., Anisimov A.V., Efremenko E.N.

Lomonosov Moscow State University, 1/3 Lenin Hills, 119991, Moscow, Russia
e-mail: olga.maslova.rabota@gmail.com

Development and implementation of new approaches to desulfurization of oil products, as well as the gradual transformation of the oil and gas sector of the economy with a focus on sustainable development are topical. At the same time, the development and application of heterogeneous chemical and / or biocatalytic (cells, enzymes) catalysts is attractive. Such catalysts are highly efficient, have an increased useful life, and can be easily concentrated on the required number of catalysis sites, in particular, at the phase boundary, and then separated from the working medium.

Key words: heterogeneous catalysis; biocatalyst; immobilized consortium; desulfurization

Oil and gas resources are still the main raw material for the fuel and chemical world industry. During the transition to sustainable development, technical solutions for the desulfurization of petroleum products, which are characterized by a low environmental load, are most in demand. They can provide not only the full extraction of sulfur-containing components from the cleaned fuel, but also provide for the rational use or resource-saving disposal of waste. Involvement in the technological cycles of renewable raw materials is also encouraged. The possibilities of the effective use of chemical and/or biological heterogeneous catalysts (HC) as part of many of the currently commercialized or developed technological solutions for oxidative or reductive desulfurization (demercaptization, hydrotreating, etc.) are demonstrated. Among the advantages of HC, it should be noted that they can be concentrated in the required amount at the phase boundary, where the main chemical desulfurization reactions take place. The method of chemical reductive desulfurization (hydrotreating), implemented on an industrial scale, involves the use of various HC ($CoO-MoO_3/Al_2O_3$, $NiO-MoO_3/Al_2O_3$, $NiO-MoO_3/Al_2O_3/SiO_2$ etc.) and provides a reduction in sulfur content by 95-98%, i.e., up to 300-500 mg/l. Achieving the required environmental regulatory values for sulfur content (not more than 10 ppm) using this technology is not economically viable. The hydrogen sulfide (product of desulfurization process) is separated, and then, through the Klaus process, sulfur is obtained from it as a commercial product. However, a promising direction in the development of green chemistry is the involvement of heterogeneous biocatalysts (BC) based on cells or enzymes in catalytic processes, including those

associated with the desulfurization of oil fractions. It is important to note that during the development of technical solutions, depending on the task with the use of BC, both reduction reactions and oxidation reactions involving sulfur-containing compounds can be implemented. Until recently, the most widely used process was biocatalytic oxidative desulfurization (4S-pathway), which, despite being environmentally friendly, is generally characterized by low rates of substrate conversion efficiency at high process time and inhibition of known BC by intermediate products.

The possibility of implementing an alternative eco-efficient hybrid process of chemical-biocatalytic desulfurization of hydrocarbon raw materials has been demonstrated [1]. At the first stage, with the use of H₂O₂, formic acid, and sodium molybdate under optimized conditions, the process of chemical oxidative desulfurization of various oil fractions can be realized rather quickly. The oxidized forms of sulfur (sulfones) obtained and separated by extraction from refined fuel, together with the waste of renewable raw materials, are then successfully bioconverted to a biogas in the presence of artificially formed and immobilized consortia specially selected for one or another raw material. It is important that during the implementation of this process, it is possible to avoid losses of the carbon skeleton extracted from fuel during the extraction of organic sulfur-containing compounds by transferring them to biogas. Sulfur is then converted to sulfide, which, if necessary, can be a source for sulfur recovery. Extractants can be obtained from renewable raw materials. Refined fuel sulfur content meets the environmental standard Euro-5 (no more than 10 ppm).

This research was funded by the RFBR (grant No.18-29-05064).

References

1. Senko O., Maslova O., Gladchenko M., Gaydamaka S., Akopyan A., Lysenko S., Karakhanov E., Efremenko, E. Prospective approach to the anaerobic bioconversion of benzo- and dibenzothiophene sulfones to sulfide // *Molecules*. – 2019. – V. 24. – №. 9. – P. 1736.

УДК 664.2:557.15 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-284-285

ДЕЙСТВИЕ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ НА РАЗЛИЧНЫЕ ВИДЫ КРАХМАЛА В НАТИВНОМ СОСТОЯНИИ

Папахин А.А., Бородина З.М.

ВНИИ крахмалопродуктов – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
 Россия, 140051, Московская обл., Люберецкий р-н, п. Красково, ул. Некрасова д.11, тел.: +7(495)-557-15-00,
 e-mail: papahin_aleksandr@mail.ru.

Проведено исследование низкотемпературного гидролиза различных видов крахмала в нативном состоянии: кукурузного, кукурузного амилопектинового, горохового, пшеничного и рисового крахмалов. Установлена различная восприимчивость крахмалов к действию фермента глюкоамилазы, изменение физико-химических свойств образцов после гидролиза.

Ключевые слова: нативный, модифицированный крахмал, глюкоамилаза, низкотемпературный гидролиз

Для проведения низкотемпературного гидролиза выбраны коммерческие нативные крахмалы, обладающие различиями в морфологических, структурных свойствах и содержании примесей: кукурузный нормальный, кукурузный амилопектиновый, пшеничный, гороховый, рисовый. Катализатором процесса гидролиза выбран препарат очищенной глюкоамилазы Optidex L-400 фирмы Du Pont, расщепляющей α-1,4-гликозидные связи в молекулах полисахаридов крахмала. Для всех видов крахмала условия следующие: концентрация СВ суспензии 32±0,5%, pH 4,2±0,1, T 52±1 °C, продолжительность инкубации 48 ч с отбором проб гидролизата через 6,12, 24, 48ч. Установлено, что амилопектиновый крахмал в нативном состоянии по отношению к глюкоамилазе обладал большей восприимчивостью и скоростью гидролиза. По достижении 48 ч инкубирования степень его гидролиза (СГК) составила 55,7%, в то время как кукурузного и горохового - 49,1% и 48,5%, соответственно, амилопектиновый же достиг этого уровня СГК уже к 30 ч гидролиза. СГК рисового и пшеничного крахмала к 48 ч составила лишь 44,8% и 46,2%. Нативный амилопектиновый крахмал показал более высокую адсорбционную способность (АДС) по сравнению с кукурузным и гороховым крахмалом (91,0%, 53,1%, 56,5%, соответственно). АДС у других видов крахмала в процессе низкотемпературного гидролиза увеличивалась, а у амилопектинового пористого крахмала несколько снизилась (с 91,0% до 87,9%). Микроскопирование образцов показало значительное повреждение поверхности гранул крахмала с образованием радиальных пор и канавок (кукурузный, амилопектиновый, рисовый), трещин и эрозийных повреждений (пшеничный, гороховый), причем в амилопектиновом крахмале

появилось много мелких осколков разрушенных гранул, что и обуславливает снижение АС. Установлено, что с повышением содержания амилозы в крахмале снижается скорость и степень гидролиза, и среди испытуемых видов крахмала наиболее приемлемым для производства ферментативно модифицированного пористого крахмала является нативный кукурузный крахмал стандартного качества со средним соотношением амилоза:амилопектин (1:4). Полученные данные низкотемпературного гидролиза нативного крахмала различных видов обладают научной и практической значимостью для дальнейшей разработки технологий ферментативного гидролиза с получением модифицированных крахмалов с различными функциональными свойствами.

UDC 664.2:557.15 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-284-285

THE EFFECT OF GLUCOAMYLASE ON VARIOUS TYPES OF STARCH IN THE NATIVE STATE

Papakhin A.A., Borodina Z.M.

*All-Russian Research Institute for starch products - branch by FSBSI «V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems» of Russian Academy of Sciences
11 Nekrasova St., Kraskovo, Moscow region, 140051, Russia
e-mail: papahin_aleksandr@mail.ru*

Was conducted a study of low-temperature hydrolysis of various types of starch in the native state: corn, corn amylopectin, pea, wheat and rice starches. Were established different susceptibility of starches to the action of the enzyme glucoamylase, changes in the physical and chemical properties of samples after hydrolysis.

Key words: native, modified starch, glucoamylase, low-temperature hydrolysis

For low-temperature hydrolysis were selected commercial native starches with differences in morphological, structural properties and impurity content: normal corn, amylopectin corn, wheat, pea, and rice. The catalyst for the hydrolysis process was selected a preparation of purified glucoamylase Optidex L-400 by Du Pont, which cleaves α -1,4-glycoside bonds in starch polysaccharide molecules. For all types of starch was used following conditions: the concentration of DM suspension $32 \pm 0.5\%$, pH 4.2 ± 0.1 , T 52 ± 1 °C, incubation duration 48 hours with hydrolysate sampling after 6.12, 24, 48 hours. It was founded, that amylopectin starch in the native state in relation to glucoamylase had a greater susceptibility and hydrolysis rate. Upon reaching 48 hours of incubation, the degree of its hydrolysis (SGC) was 55.7%, while corn and pea - 49.1% and 48.5%, respectively, amylopectin reached this level of SGC by 30 hours of hydrolysis. The SGC of rice and wheat starch was only 44.8% and 46.2% by 48 hours. Native amylopectin starch showed a higher adsorption capacity (ADC) compared to corn and pea starch (91.0%, 53.1%, 56.5%, accordingly). ADC in other types of starch during low-temperature hydrolysis increased, and in amylopectin porous starch decreased slightly (from 91.0% to 87.9%). Microscopy of samples showed significant damage to the surface of starch granules with the formation of radial pores and grooves (corn, amylopectin, rice), cracks and erosion damage (wheat, pea), and in amylopectin starch appeared many small fragments of destroyed granules, which causes a decrease in as. It was found that with an increase in the amylose content in starch, the rate and degree of hydrolysis decreases, and among the tested types of starch, the most acceptable for the production of enzymatically modified porous starch is native corn starch of standard quality with an average ratio of amylose:amylopectin (1:4). The obtained data on low-temperature hydrolysis of native starch of various types have scientific and practical significance for further development of technologies for enzymatic hydrolysis to obtain modified starches with different functional properties.

УДК 579.66 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-286-288

ВЛИЯНИЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ АКТИВНОСТИ РАЗНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР В ПРОЦЕССЕ НАКОПЛЕНИЯ СВАЛОЧНОГО ГАЗА

Сенько О.В., Степанов Н.А., Маслова О.В., Ефременко Е.Н., Перминова И.В.

¹ Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия 119991, Москва, Ленинские горы, 1/3

² Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, РАН, Москва, Россия 119334, Москва, ул. Косыгина, 4
 e-mail: elena_efremenko@list.ru

Гуминовые вещества активно предлагаются к использованию в сельском хозяйстве и медицине как источник биологически активных веществ для человека и животных. В тоже время они могут быть применены в качестве антимикробного препарата для подавления жизнедеятельности микроорганизмов с целью снижения выделений биогаза на свалках и полигонах (свалочного газа). Биогаз из отходов и мусора образуется в результате ряда последовательно протекающих процессов, катализируемых метаногенными консорциумами микроорганизмами, ключевыми из которых являются бактерии и археи. В этой связи важно понимать, как гуминовые вещества могут влиять на метаболизм бактериальных культур, ответственных за различные стадии метаногенеза, чтобы сделать более контролируемым газовыделение на свалках и уметь его подавлять.

Ключевые слова: гуминовые вещества; бактерии; свалочный газ; метаболизм

Применение гуминовых веществ (ГВ) для снижения выделений метана на мусорных полигонах является актуальным [1]. При этом важно понимать, какую стадию процесса метаногенеза [2] подавляет тот или иной образец ГВ.

Разница в действии ГВ на микробные консорциумы и отдельные бактериальные клетки связана, в первую очередь, с различиями в их химическом составе. Известно, что фульвокислоты (ФК) характеризуются наличием в структуре молекул большим количеством алифатических групп и меньшим ароматических, что обуславливает их гидрофильные свойства, в отличие, например, от гумата калия (ГК), характеризующегося большей гидрофобностью благодаря наличию ароматических групп [1].

В данной работе было обнаружено, что введение ГК в среды с чистыми бактериальными культурами приводило к снижению общего энергетического статуса клеток. Ингибирующий эффект ГК на клетки увеличивался с повышением концентрации ГК в исследуемом диапазоне концентраций (1-10 г/л), вводимых в исследуемые среды. Бактерии *Clostridium acetobutylicum* оказались наиболее чувствительными к присутствию ГК в среде.

Анализ кинетики накопления H_2 чистыми культурами бактерий *C. acetobutylicum* и *Enterobacter faecalis* показал, что увеличение содержания в среде ГВ в исследованном диапазоне концентраций снижает синтез этого газа клетками. Полученные данные четко коррелируют со снижением общего энергетического статуса клеток.

В отличие от ГК, который исключительно отрицательно воздействовал на клетки, влияние ФК на энергетический статус бактерий был неоднозначным. В частности, концентрация внутриклеточного аденозинтрифосфата (АТФ) в клетках бактерий *Pseudomonas sp* увеличивалась по сравнению с исходными значениями в 1,3 раза при увеличении концентрации ФК в среде. А в случае бактериальных клеток *C. acetobutylicum* и *E. faecalis* концентрация АТФ снижалась с увеличением концентрации ФК в среде.

Высокую метаболическую активность именно *Pseudomonas sp* клеток в присутствии ГВ особенно важно учитывать, поскольку эти бактерии широко распространены в природе и способны использовать для роста широкий спектр субстратов, а также они способны к образованию устойчивых биопленок. Благодаря наличию экзополимерного матрикса клетки внутри биопленок характеризуются значительно более высокой устойчивостью к действию антибактериальных факторов.

Было показано, что в случае грамотрицательных бактерий *Pseudomonas sp*. введение в среду ФК приводило к увеличению энергетического статуса клеток в отличие от грамположительных *E. faecalis* и *C. acetobutylicum*. Этот эффект может быть связан с тем, что ГВ могут связываться с клеточной стенкой бактерий, изменяя процессы массообмена [3].

В результате проведенных исследований был сделан вывод о том, что влияние различных ГВ (ГК и

ФК), введенных в среду в разных концентрация, на метаболическую активность бактериальных клеток зависит, в первую очередь, как от типа клеток, так и от химического состава самих ГВ.

Выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант 18-29-25065)

Литература

1. Stepanov N., Senko O., Perminova I., Efremenko E. A new approach to assess the effect of various humic compounds on the metabolic activity of cells participating in methanogenesis. // *Sustainability*. - 2019. - V. 11 - 3158–11 p.
2. *Immobilized cells: biocatalysts and processes : monograph / Ed. by Doctor of Biological Sciences, Professor E.N. Efremenko. — M. : RIOR, 2018. —500 + 24 c. colored inset. — ISBN 978-5-369-02004-3.*
3. Yap S. D., Astals S., Lu Y., Peces M., Jensen P. D., Batstone D. J., Tait, S. Humic acid inhibition of hydrolysis and methanogenesis with different anaerobic inocula. // *Waste Management* - 2018. - V. 80. - P. 130-136.

UDC 579.66 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-286-288

INFLUENCE OF HUMIC SUBSTANCES ON METABOLYC ACTYVITY OF VARIOUS BACTERIAL CULTURES IN LANDFILL GAS PRODUCTION

Senko O.V., Stepanov N.A., Maslova O.V., Efremenko E.N., Perminova I.V.

¹ Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia, Lenin Hills, 1/3

² Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia, 119334, Kosygina st., 4
e-mail: elena_efremenko@list.ru

Humic substances are actively used in agriculture and medicine as a source of biologically active substances for humans and animals. At the same time, they can be used as an antimicrobial substance for suppress of microorganisms activity and reduce biogas emissions from landfills. Biogas from waste and garbage is formed during consecutively processes catalyzed by methanogenic consortia of microorganisms, which contain bacteria and archaea. Therefore, it is important to understand how humic substances can be affected on metabolism of bacterial cultures responsible for the various stages of methanogenesis to suppress gas emission from landfills or make whis process more controlled.

Key words: humic substances; bacteria; landfill gas; metabolism

The use of humic substances (HS) to reduce methane emissions from landfills is an actual problem [1]. It is important to understand which stage of the methanogenesis can be successfully suppressed by one or another HS sample [2].

The difference in the effect of HS on microbial consortia and individual bacterial cells is primarily due with their various chemical compositions. It is known that fulvic acids (FAs) are characterized by the presence in molecule structure a large number of aliphatic and less aromatic groups, which determines their hydrophilic properties, as compared with potassium humate (PH), characterized by greater hydrophobicity by presence of aromatic groups [1].

It was found in this work that PH introduced in the medium with pure bacterial cultures led to a decrease in the overall energy status of the cells. The inhibitory effect of PH on cells increased with increasing PH concentration in the medium on studied range of concentrations (1-10 g/L). The *Clostridium acetobutylicum* cells were the most sensitive to the PH presence in the medium.

Analysis of the kinetics of H₂ accumulation by pure cultures of *C. acetobutylicum* and *Enterococcus faecalis* showed that increasing HC concentration in the medium led to reduction of the gas synthesis by these bacteria. The obtained data clearly correlate with a decreasing in the overall energy status of cells.

In contrast to PH, which characterized only negative effect on cells, the effect of FA on the energy status of bacteria was ambiguous. Particularly, increasing concentration of FA in the medium led to enlarge the concentration of intracellular adenosine triphosphate (ATP) in *Pseudomonas* sp cells by 1.3 times compared with the initial values. However ATP concentration of *C. acetobutylicum* and *E. faecalis* cells, decreased with increasing of FA concentration in the medium.

It is especially important to consider high metabolic activity of *Pseudomonas* sp cells in the presence of FA, because these bacteria are widely spread in nature and able to use a wide range of substrates for growth. They are also capable of forming stable biofilms. Due to the presence of an exopolymer matrix the cells inside biofilms are characterized by significantly higher resistance to the action of antibacterial factors.

It was shown that in the case of gram-negative bacteria (*Pseudomonas* sp) the introduction of FA into the medium led to an increase of cells energy status as compared to gram-positive (*E. faecalis* and *C. acetobutylicum*)

bacteria. This effect can be due with HS ability to bind with bacterial cell wall, changing the processes of mass transfer [3].

As a result it was concluded that the effect of various HS (PH and FA) introduced into the medium at different concentrations on the metabolic activity of bacterial cells primarily depends from the type of bacterial cells and chemical composition of the HS.

This research was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant No. 18-29-25065).

References

1. Stepanov N., Senko O., Perminova I., Efremenko E. A new approach to assess the effect of various humic compounds on the metabolic activity of cells participating in methanogenesis. // *Sustainability*. - 2019.- V. 11 - 3158–11 p.
2. *Immobilized cells: biocatalysts and processes: monograph* / Ed. by Doctor of Biological Sciences, Professor E.N. Efremenko. – M.: RIOR, 2018. –500 + 24 c. colored inset. – ISBN 978-5-369-02004-3.
3. Yap S. D., Astals S., Lu Y., Peces M., Jensen P. D., Batstone D. J., Tait, S. Humic acid inhibition of hydrolysis and methanogenesis with different anaerobic inocula. // *Waste Management* - 2018. - V. 80. - P. 130-136.

УДК 632.959 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-288-290

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ХИТИНАЗЫ 19 СЕМЕЙСТВА ИЗ *D. CAPENSIS*

Синельников И.Г., Чулкин А. М., Рожкова А. М., Сеницын А.П.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия
 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2
 e-mail: Sinelnikov.i@list.ru

Клонирована последовательность хитиназы 19 семейства из *Drosera capensis*. Реализована экспрессия в различных штаммах *E.coli* и разработана методика рефолдинга. Описаны первичные биохимические характеристики полноразмерной хитиназы и ее формы без хитинсвязывающего домена.

Ключевые слова: хитиназа, рефолдинг, гетерологическая экспрессия, GH19

Хитиназы подразделяются на два основных семейства. Хитиназы 18 семейства являются широко изученным классом ферментов, представлены практически во всех группах организмов и обладают широким спектром физиологических функций. Грибные продуценты 18 семейства используются в сельском хозяйстве для защиты растений от фитопатогенов и вредителей. Хитиназы 19 (GH19) менее изучены, однако их потенциал как агента биоконтроля может существенно превосходить хитиназы 18 семьи, так как эволюционно они представляют собой белки иммунного ответа высших растений в ответ на заражение фитопатогенами. Хитиндеградирующая активность хитиназ определяет их практическое применение в качестве защитных агентов против патогенных организмов, таких как грибы и насекомые, что позволяет перейти к биоконтролю распространения фитопатогенов, элиминировав стадию обработки с/х растений мутагенными пестицидами.

Настоящая работа посвящена клонированию и гетерологической экспрессии хитиназы 19 семейства (GH19) из насекомоядных растений *Drosera capensis*, способных эффективно разрушать экзоскелет насекомых.

Из растений, полученных *in vitro*, были выделены РНК и ДНК, модифицированным СТАВ методом [1]. Последовательность гена хитиназы была восстановлена методом TAIL-PCR [2] и депонирована в базу данных GenBank (MK093978). Длина гена составила 2,443 п.о., включая три интрона. Предсказанная открытая рамка считывания состояла из 978 нуклеотидов, и была подтверждена амплификацией кодирующей последовательности с кДНК. Белок, длиной 325 аминокислотных остатков, кодируемый полученной последовательностью, представляет собой классическую хитиназу 19 семейства имеющую двудоменную структуру и сигнальный пептид на С-концевом участке. В данной работе была осуществлена гетерологическая экспрессия полноразмерной GH19 и GH19 без хитинсвязывающего домена в различных штаммах *E.coli*: *Arctic Express (DE3)*, *Rosetta™(DE3)*, *Rosetta-gami™ 2(DE3)* и *Shuffle (DE3)*. Однако, ни в одном из штаммов не удалось реализовать экспрессию целевого белка в растворимой форме. Для восстановления нативной структуры GH19 из телец включения, был оптимизирован протокол рефолдинга в системе окисленного и восстановленного глутатионов [3].

Для полученной гомогенной хитиназы был определен температурный и pH оптимум, который составил 55°C и 4,5 соответственно. В оптимальных условиях активность хитиназы по коллоидному хитину составила 0,56 ед/мг для полноразмерной хитиназы и 0,14 ед/мг для формы без хитинсвязывающего домена. Неспецифические активности по другим полисахаридам (микрористаллическая целлюлоза, ксилан, карбоксиметилцеллюлоза) не обнаружены.

Таким образом, в работе был осуществлен направленный поиск и клонирование хитиназ 19-ого семейства из *Drosera capensis*. Описаны первичные биохимические характеристики, определен pH и температурный оптимумы. Совокупность характеристик полученного фермента демонстрирует актуальность дальнейшего изучения фунгицидных и фитопротекторных свойств, с целью создания биопрепаратов для контроля фитопатогенов.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, в рамках Соглашения 05.616.21.0128 (RFMEFI61620X0128).

Литература

1. Fleischmann A., Heubl G. Overcoming DNA extraction problems from carnivorous plants // *An. del Jardín Botánico Madrid*. 2009. Vol. 66. №. 2. P. 209-215.
2. Jia X., Lin X., Chen J. Linear and exponential TAIL-PCR: a method for efficient and quick amplification of flanking sequences adjacent to Tn5 transposon insertion sites // *AMB Express*. 2017. Vol. 7. №. 1. P. 195-203.
3. Moghadam M., Ganji A., Varasteh A., Falak R., Sankian M. Refolding process of cysteine-rich proteins: Chitinase as a model Rep // *Biochem. Mol. Biol.* 2015. Vol. 4, No. 1, P. 19-24.

UDC 632.959 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-288-290

CLONING AND EXPRESSION OF CHITINASE 19 FAMILIE FROM *D.CAPENSIS*

Sinelnikov I. G., Chulkin, A. M., Rozhkova A. M., Sinitsyn A.P.

Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Science»

119071, Moscow, Leninsky Prospect, 33, building 2

e-mail: Sinelnikov.i@list.ru

Sequence of family 19 chitinase was cloned from *Drosera capensis*. Implemented expression in different strains of *E.coli* and developed a refolding method. Describes the primary biochemical characteristics of the full-length chitinase and its shape without chitin-binding domain.

Key words: chitinase, refolding, heterologous expression, GH19

Chitinases are divided into two main families. Family 18 chitinases are widely studied class of enzymes are presented in almost all groups of organisms and possess a broad spectrum of physiological functions. Fungal producers 18 family are used in agriculture for the protection of plants against plant pathogens and pests. Chitinases of family 19 (GH19) less studied, but their potential as a biocontrol agent can significantly exceed the chitinases family 18, since they are evolutionary proteins immune response of higher plants in response to infection by phytopathogens. Chitin-degrading activity determines practical use of chitinases as protective agents against pathogenic organisms such as fungi and insects. These properties allow the use of chitinases for biocontrol of plant pathogens and eliminate the step of treating with mutagenic pesticides of agricultural plants.

This article focuses on the cloning and expression of heterologous chitinase family 19 (GH19) of the carnivorous plant *Drosera capensis*, that can effectively destroy the exoskeleton of an insect.

We were isolated RNA and DNA from plants obtained *in vitro* by modified CTAB method [1]. The sequence of the chitinase gene was reconstruct by TAIL-PCR [2] and submission in the GenBank data base (MK093978). Gene length was 2,443 bp, including three introns. The predicted open reading frame composed of 978 nucleotides was confirmed by amplifying the coding sequence from the cDNA. Protein encoded by this sequence has a length of 325 amino acid residues and represents a classical chitinase having two domain and a signal peptide at the C-terminal region.

In this work was carried heterologous expression of full GH19 and GH19 without chitin-binding domain in different strains of *E.coli*: *Arctic Express (DE3)*, *Rosetta™(DE3)*, *Rosetta-gami™ 2(DE3)* and *Shuffle (DE3)*. However, soluble form of protein wasn't obtained in any of the strains. To restore the native structure GH19 from inclusion bodies, refolding protocol was optimized. Refolding of inclusion bodies was carried out in the system of oxidized and reduced glutathione

To the resulting homogeneous chitinase was determined optimum temperature and pH, which was 55 °C and 4,5 respectively. Under optimal conditions, the activity of chitinase for colloidal chitin was 0,56 U/mg for a full-size chitinase and 0,14 U/mg for a form without a chitin-binding domain. Nonspecific activity for other polysaccharides (microcrystalline cellulose, xylan, carboxymethylcellulose) is not detected.

In this way, the work was carried out a directed search and cloning of chitinase 19 family from *Drosera capensis*. Primary biochemical characteristics are described, and the optimum pH and temperature are determined. The set of characteristics of the obtained enzyme demonstrates the relevance of further study of fungicidal and phytoprotective properties, in order to create biological products for the control of phytopathogens.

This work was supported by the Ministry of science and higher education of the Russian Federation under the agreement 05.616.21.0128 (RFMEFI61620X0128).

References

1. Fleischmann A., Heubl G. Overcoming DNA extraction problems from carnivorous plants // *An. del Jardín Botánico Madrid*. 2009. Vol. 66. № 2. P. 209-215.
2. Jia X., Lin X., Chen J. Linear and exponential TAIL-PCR: a method for efficient and quick amplification of flanking sequences adjacent to Tn5 transposon insertion sites // *AMB Express*. 2017. Vol. 7. №. 1. P. 195-203.
3. Moghadam M., Ganji A., Varasteh A., Falak R., Sankian M. Refolding process of cysteine-rich proteins: Chitinase as a model Rep // *Biochem. Mol. Biol.* 2015. Vol. 4, № 1, P. 19-24.

УДК 579.66 : 663.1 : 577.32 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-290-292

ОСНОВНЫЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СТАДИИ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ ИЗ ЛЕГКОВОЗОбновляемого ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ С ПОМОЩЬЮ СИМБИОТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ *MEDUSOMYCES GISEVII SA-12*

**Скиба Е.А., Будаева В.В., Гладышева Е.К., Шавыркина Н.А., Павлов И.Н., Голубев Д.С., Миронова Г.Ф.,
 Кащеева Е.И., Гисматулина Ю.А., Корчагина А.А., Сакович Г.В.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Бийск, Россия
 659322, Бийск, ул. Социалистическая, 1,
 e-mail: ipcet@mail.ru, eas08988@mail.ru

Разработана технология получения бактериальной наноцеллюлозы из шелухи овса и мискантуса. Установлено, что независимо от вида сырья и способа его предварительной обработки, продуцент *Medusomyces gisevii Sa-12* синтезирует бактериальную наноцеллюлозу высокого качества.

Ключевые слова: мискантус, шелуха овса, предварительная химическая обработка, *Medusomyces gisevii Sa-12*, бактериальная наноцеллюлоза

Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) – востребованный в различных отраслях экономики продукт с высокой добавленной стоимостью, спектр применения которого продолжает расширяться [1]. Однако проблема реализации крупномасштабного производства БНЦ остаётся не решенной в силу ряда объективных причин, поэтому сохраняется её высокая стоимость. Концепция получения высокоценной БНЦ из малоценной растительной целлюлозы является одним из устойчивых путей решения данной проблемы [2].

Для получения БНЦ использовано два вида легко возобновляемого целлюлозосодержащего сырья: массовый отход сельского хозяйства шелуха овса и биомасса быстрорастущей технической злаковой культуры мискантуса. В разработанной технологии на первом этапе сырьё подвергают химической предобработке, на втором этапе полученные субстраты подвергают ферментативному гидролизу [3]. На третьем этапе из полученного преимущественно глюкозного ферментативного гидролизата готовят стандартизованную питательную среду, в которую вносят экстракт чёрного чая. На четвёртом этапе проводят микробиологический биосинтез БНЦ с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii Sa-12*. На пятом этапе осуществляют промывку БНЦ. На шестом этапе БНЦ стерилизуют и упаковывают, либо высушивают лиофильным способом и упаковывают [4].

В результате выполненных работ найдены технологические режимы предварительной обработки сырья, позволяющие получить высококачественный субстрат, ферментативный гидролиз которого позволяет

получить биологически доброкачественную среду – двухстадийная обработка разбавленными растворами азотной кислоты и гидроксида натрия; научно обосновано использование в качестве продуцента *Medusomyces gisevii* Sa-12, доказана способность продуцента эффективно работать на сложных гидролизных средах в нестерильных условиях без добавок витаминов, минеральных солей и стимуляторов биосинтеза; установлено, что независимо от вида сырья и способа его предварительной обработки, культура *Medusomyces gisevii* Sa-12 способна синтезировать БНЦ со степенью кристалличности – 86-93 % и содержанием алломорфа I-альфа – 96-100 %. Это уникальные характеристики, превышающие все известные мировые аналоги.

Исследования выполнены при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск, Россия) за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054).

Литература

1. Campano C., Balea A., Blanco A., Negro C. Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review // *Cellulose*. 2016. Vol. 23. P. 57–91.
2. Hussain Z., Sajjad W., Khan T., Wahid F. Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review // *Cellulose*. 2019. Vol. 26. P. 2895–2911.
3. Kashcheyeva E.I., Gismatulina Y.A. Budaeva V.V. Pretreatments of Non-Woody Cellulosic Feedstocks for Bacterial Cellulose Synthesis // *Polymers*. 2019. Vol. 11. № 10. P. 1645. doi:10.3390/polym11101645
4. Skiba E.A., Budaeva V.V., Ovchinnikova E.V., Gladysheva E.K., Kashcheyeva E.I., Pavlov I.N., Sakovich G.V. A technology for pilot production of bacterial cellulose from oat hulls // *Chem. Eng. J.* 2020. Vol. 383. P. 123128. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123128>

UDC 579.66 : 663.1 : 577.32 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-290-292

MAIN TECHNOLOGICAL STAGES OF BACTERIAL CELLULOSE SYNTHESIS FROM EASILY RENEWABLE CELLULOSIC FEEDSTOCKS BY *MEDUSOMYCES GISEVII SA-12* SYMBIOTIC CULTURE

Skiba E.A., Budaeva V.V., Gladysheva E.K., Shavyrkina N.A., Pavlov I.N., Golubev D.S., Mironova G.F., Kashcheyeva E.I., Gismatulina Yu.A., Korchagina A.A., Sakovich G.V.

Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (IPCET SB RAS), Biysk, Russia
659322, Biysk, Altai Krai, ul. Sotsialisticheskaya 1
e-mail: ipcet@mail.ru, eas08988@mail.ru

A technology has been developed for the synthesis of bacterial nanocellulose from oat hulls and *Miscanthus*. The *Medusomyces gisevii* Sa-12 microbial producer was found to synthesize bacterial nanocellulose of high quality, regardless of the feedstock type and pretreatment method thereof.

Key words: *Miscanthus*, oat hulls, chemical pretreatment, *Medusomyces gisevii* Sa-12, bacterial nanocellulose

Bacterial nanocellulose (BNC) is a high-value-added product demanded in various economic sectors and its application range keeps expanding further [1]. However, the problem of establishing a large-scale manufacture of BNC remains unsolved due to a number of objective reasons and the cost of BNC is therefore still high. The concept of BNC synthesis from low-value plant cellulose is among sustainable ways to tackle that problem [2].

Here we utilized two easily renewable cellulosic feedstocks for the synthesis of BNC: oat hulls, a massive agricultural residue, and industrial crop *Miscanthus*. The first stage in the developed technology is the chemical pretreatment of feedstocks, and the second stage is the enzymatic hydrolysis of the resultant pulps [3]. At the third stage, a standardized nutrient medium is prepared from the obtained enzymatic hydrolysis and a black-tea extract is added thereto. The fourth stage is the microbiological synthesis of BNC by the *Medusomyces gisevii* Sa-12 symbiotic culture. The fifth stage is where BNC is washed. At the sixth stage, BNC is either sterilized and packed or freeze-dried and packed [4].

This study has eventually identified process conditions for feedstock pretreatment affording a high-quality substrate whose enzymatic hydrolysis furnishes a biologically good medium, that is, a two-stage pretreatment with dilute solutions of HNO₃ and NaOH. The use of *Medusomyces gisevii* Sa-12 as a microbial producer has

scientifically been substantiated; the producer capability of effectively functioning in sophisticated hydrolyzate media under non-sterile conditions without adding vitamins, mineral salts and biosynthesis stimulators has been proven; and *Medusomyces gisevii* Sa-12 has been found to produce BNC with 86-93 % crystallinity index and 96-100 % I- α allomorph content, irrespective of the feedstock type and pretreatment method thereof. These unique features excel all the worldwide known counterparts.

The research was performed using instruments provided by the Biysk Regional Center for Shared Use of Scientific Equipment of the SB RAS (IPCET SB RAS, Biysk). The research was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 17-19-01054).

References

1. Campano C., Balea A., Blanco A., Negro C. Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review // *Cellulose*. 2016. Vol. 23. P. 57–91.
2. Hussain Z., Sajjad W., Khan T., Wahid F. Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review // *Cellulose*. 2019. Vol. 26. P. 2895–2911.
3. Kashcheyeva E.I., Gismatulina Y.A. Budaeva V.V. Pretreatments of Non-Woody Cellulosic Feedstocks for Bacterial Cellulose Synthesis // *Polymers*. 2019. Vol. 11. № 10. P. 1645. doi:10.3390/polym11101645
4. Skiba E.A., Budaeva V.V., Ovchinnikova E.V., Gladysheva E.K., Kashcheyeva E.I., Pavlov I.N., Sakovich G.V. A technology for pilot production of bacterial cellulose from oat hulls // *Chem. Eng. J.* 2020. Vol. 383. P. 123128. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123128>

УДК 663.11; 579.64 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-292-294

БИОКОНВЕРСИЯ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ РАСТЕНИЕВОДСТВА В БИОМЕЛИОРАНТЫ, ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Смирнова И.Э., Саданов А.К.

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Казахстан, 050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 105
 e-mail: iesmirnova@mail.ru

Разработан способ биоконверсии целлюлозосодержащих отходов растениеводства (пшеничная, рисовая солома и др.) с помощью бактерий *Bacillus cytaseus*. Процесс проводили путем твердофазной ферментации без доступа кислорода по смешенному типу брожения углеводов. Использование продукта ферментации в качестве биомелиоранта для сельского хозяйства эффективнее, чем традиционное применение растительных отходов.

Ключевые слова: биоконверсия; отходы растениеводства; бактерии; твердофазная ферментация; биомелиорант.

Биоконверсия возобновляемых растительных отходов в топливо, кормовые и пищевые продукты, сырье для химической и микробиологической промышленности рассматривается, в настоящее время, как одна из ключевых отраслей биотехнологии [1]. Использование этой огромной массы отходов, загрязняющей окружающую среду, и при этом, являющейся ценным источником энергии, ставит задачу ее утилизации и/или конверсии в полезные продукты [2]. В тоже время, такие возобновляемые целлюлозосодержащие отходы растениеводства, как пшеничная и рисовая солома, стебли хлопчатника, хлопковая и рисовая шелуха, кукурузная кочерыжка, подсолнечная лузга, шелуха и др. практически не используются для нужд народного хозяйства и, накапливаясь, загрязняют окружающую среду. В этой связи, утилизация отходов, образуемых при производстве растениеводческой продукции, остается одной из актуальных проблем окружающей среды и хозяйствующих субъектов. Применение отходов растениеводства в земледелии существует очень давно. Однако преимущественная локализация углерода в составе структурированных целлюлозных и олигниновых компонентов нередко оказывается фактором, существенно снижающим деградацию этих материалов микроорганизмами [3]. Разработан способ биоконверсии отходов растениеводства (пшеничная и рисовая солома, рисовая шелуха, кукурузные стебли, листья, кочерыжка) с помощью специально отселекционированного ацидотолерантного штамма целлюлолитических бактерий *Bacillus cytaseus*. Биоконверсию отходов растениеводства осуществляли по типу твердофазной ферментации в условиях без доступа кислорода, процесс состоял из комплекса процессов, связанных с деполимеризацией целлюлозы, деструкцией растительных компонентов и сбраживанием углеводов по

смешенному типу брожения, которое характеризовалось образованием молочной, уксусной, пропионовой и масляной кислоты. Показателем завершенности процесса ферментации служило снижение значения pH до 4,5-4,7 и соотношение карбоновых кислот в конечном продукте. Содержание целлюлозы и гемицеллюлоз в процессе ферментации снижалось на 12-15% и на 15-29% в зависимости от исходного сырья. Использование ферментированных отходов растениеводства в качестве биомелиоранта в сельском хозяйстве гораздо эффективнее, чем традиционное прямое использование растительных отходов, так как приводит к ускоренному разложению ферментированных отходов и активизации микробных почвенных процессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан (грант № AP05131526).

Литература

1. Сазонова И.А., Щербаков А.А. Биотехнология защиты окружающей среды. – Саратов: ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ», 2016. 51 с.
2. Lizardi-Jiménez M.A., Hernández-Martínez R. Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass // 3 Biotech. 2017. Vol.7. № 1. P. 44.
3. Ильин Д.Ю., Ильина Г.В., Сашенкова С.А., Галиуллин А.А.. Приемы селекции организмов-продуцентов целлюлаз, перспективных в биоконверсии отходов сельскохозяйственного производства // Нива Поволжья. – 2019. – № 3(52). – С. 97-105.

UDK 663.11; 579.64 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-292-294

BIOCONVERSION OF PLANT CELLULOSE-CONTAINING WASTES TO THE BIOMELIORANTS FOR AGRICULTURE

Smirnova I.E., Sadanov A.K.

LLC "Research and Production Center for Microbiology and Virology"
Kazakhstan, 050010, Almaty, st. Bogenbai batyr, 105
e-mail: iesmirnova@mail.ru

A bioconversion of plant cellulose-containing wastes (wheat and rice straw and etc.) was developed with cellulolytic bacteria *Bacillus cytaseus*. The process was carried out by solid state fermentation with oxygen hypoxia, including the mixed type fermentation of carbohydrates. The application of a fermented product as a biomeliorant for agriculture is more effective than the traditional use of crop wastes.

Key words: bioconversion; waste; bacteria; solid state fermentation; biomeliorant

Bioconversion of renewable plant wastes into fuel, feed and food products, as well as raw materials for the chemical and microbiological industry is one of the main directions of biotechnology [1]. The use of a huge mass of plant wastes that pollutes the environment and is a valuable source of energy poses the problem of its utilization and / or conversion into useful products [2]. At the same time, renewable plant cellulose-containing wastes such as wheat and rice straw, cotton stalks, cotton and rice husks, corn cobs, sunflower husks, husks and etc. are practically not used, accumulating and polluting the environment. In this regard, the utilization of wastes generated in the production of crops remains one of the pressing environmental problems. Their application in agriculture has existed for a very long time. However, the localization of carbon in the structured cellulosic and oligin components is a factor that reduces the degradation of these wastes by microorganisms [3]. A bioconversion of plant wastes (wheat and rice straw, rice husk, corn leaves, stems, stalk) was developed with a specially selected acid-tolerant strain of cellulolytic bacteria *Bacillus cytaseus*. Bioconversion of plant waste was carried out as solid state fermentation under conditions without oxygen. The process consisted of complex of processes related to cellulose depolymerization, destruction of plant components and utilization of carbohydrates according to a mixed type of fermentation with the formation of lactic, acetic, propionic and butyric acid. An indicator of the ending of fermentation was a decrease in pH to 4.5-4.7 and the ratio of carboxylic acids in the final product. The content of cellulose and hemicellulose in the fermentation process is reduced by 12-15% and 15-29%, depending on the wastes. The application of fermented crop wastes as a biomeliorant in agriculture is much more efficient, than the traditional use of plant wastes, as it leads to the rapid degradation of fermented wastes and activation of microbial soil processes.

This work was funded by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (grant No. AR05131526).

References

1. Sazonova I.A., Scherbakov A.A. *Biotechnology of environmental protection*. – Saratov: FSBEI HE Saratov State Agrarian University, 2016. 51 p.
2. Lizardi-Jiménez M.A., Hernández-Martínez R. *Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize wastes and biomass* // 3 *Biotech*. 2017. Vol.7. № 1. P. 44.
3. Ilyin D.Yu., Ilyina G.V., Sashenkova S.A., Galiullin A.A. *Techniques for the selection of cellulase-producing organisms promising in the bioconversion of agricultural wastes* // *Volga Region Farmland*. – 2019. – No. 3(52). – P. 97-105.

УДК: 573.6:665.231, ББК: 36-1 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-294-295

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЕМОМ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛА ПЧЕЛИНОГО ВОСКА В КАЧЕСТВЕ СТРУКТУРООБРАЗОВАТЕЛЯ ОЛЕОГЕЛЕЙ

Р.В.Соболев, В.А.Саркисян, Ю.В.Фролова

Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи
 Россия, 109240, Москва, Устьинский проезд, 2/14, e-mail: sobolevrv@bk.ru, 89990010612,
 e-mail: sarkisyan@ion.ru, e-mail: himic14@mail.ru

Изучены характеристики отдельных фракций пчелиного воска и их бинарных комбинаций, отражающих потенциал формирования структурообразующих свойств в пищевых олеогелях. Повышение эффективности использования пчелиного воска в составе олеогелей, достигается биотехнологическим путем для повышения содержания свободных жирных кислот и спиртов в его составе.

Ключевые слова: Ключевые слова: биотехнологические приемы, пищевые олеогели, фракции пчелиного воска, свободные жирные кислоты и спирты, структурообразователи

Пчелиный воск имеет сложный фракционный состав, представленный углеводородами, моно-, ди- и триэфирами высокомолекулярных кислот и спиртов, свободными жирными кислотами и спиртами, а также гидрокси моно- и полиэфирами.

В последнее время пчелиный воск, свободные жирные кислоты и спирты активно изучаются в качестве структурообразователей олеогелей, которые могут быть использованы для частичной замены жиров в пищевых продуктах. Использование олеогелей в пищевой промышленности в настоящее время находится на начальном этапе исследований, связанных, в первую очередь, с поиском новых структурообразователей [1, 2].

Целью данной работы являлось выделение и изучение свойств отдельных фракций пчелиного воска и их комбинаций как перспективных структурообразователей для получения олеогелей. Для решения этой задачи были использованы методы, для характеристики структурообразующих свойств: дифференциально-сканирующая калориметрия - для определения фазовых переходов отдельных фракций и построения диаграмм фазовых состояний их бинарных комбинаций, спектроскопия с преобразованием Фурье - для анализа инфракрасных спектров и реологические характеристики, в том числе энергия сдвига, модуль Юнга и предел текучести.

В исследовании использовали отдельные фракции пчелиного воска, полученные с помощью метода препаративной флеш-хроматографии с применением растворителей, разрешенных в пищевой промышленности (гексан, ацетон, изопропиловый спирт).

Совокупность выполненных исследований позволила установить, что отдельные фракции имеют различия в морфологических особенностях кристаллов, играющих большое значение в структурообразовании. Их бинарные комбинации образуют эвтектические и монотектические смеси, в отдельных случаях - твердые непрерывные расплавы. Исследования реологических характеристик олеогелей на основе отдельных фракций (восковые эфиры, свободные жирные кислоты и спирты) показали, что комбинирование восковых эфиров как отдельно с фракциями жирных кислот, так и с добавлением спиртов, способствует повышению значений следующих характеристик: энергии сдвига, модуля Юнга и предела текучести. Разделение пчелиного воска методом препаративной флеш-хроматографии позволяет получать фракции, являющиеся более эффективным структурообразователем пищевых олеогелей, чем нативный воск. Практические возможности создания эффективного структурообразователя в виде смеси восковых

эфиров, свободных жирных кислот и спиртов связаны с процессом направленного ферментативного гидролиза нативного пчелиного воска.

Финансирование: Исследование выполнено в рамках гранта Российского научного фонда (проект № 19-16-00113).

Литература

1. Кочеткова А.А., Саркисян В.А., Коденцова В.М., Фролова Ю.В., Соболев Р.В. Пищевые олеогели: свойства и перспективы использования // *Пищевая промышленность*. – 2019. №8. – С.30-35.
2. Singh A., Auzanneau F.-I., Rogers M.A. *Advances in edible oleogel technologies - A decade in review // Food Research International*. 2017. № 97. P.307-317.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-294-295

PROSPECTS FOR USING BIOTECHNOLOGICAL METHODS TO INCREASE THE POTENTIAL OF BEESWAX AS A STRUCTURAL OLEOGEL WAX

R.Sobolev, V.Sarkisyan, Y.Frolova

Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety
Russia, 109240, Moscow, Ustyinsky proyezd, 2/14

The characteristics of individual fractions of beeswax and their binary combinations, reflecting the potential for the formation of structural forming properties in food oleogels, have been studied. Increasing the efficiency of beeswax usage in oleogels can be achieved by biotechnological means to increase the content of free fatty acids and alcohols in its composition.

Key words: Keywords: biotechnological methods, food oleogels, beeswax fractions, free fatty acids, and alcohols, structuring agents

Beeswax has a complex fractional composition, represented by hydrocarbons, mono-, di- and triesters of high molecular weight acids and alcohols, free fatty acids and alcohols, as well as hydroxy mono- and polyesters.

Recently, beeswax, free fatty acids, and alcohols have been actively studied as structural agents of oleogels, which can be used to partially replace fats in foods. The use of oleogels in the food industry is currently at the initial stage of research related primarily to the search for new structure-forming agents [1, 2].

The purpose of this work was to isolate and study the properties of individual fractions of beeswax and their combinations as promising structure-formers to produce oleogels. To solve this problem, methods were used to characterize the structure-forming properties: differential scanning calorimetry - to determine the phase transitions of individual fractions and diagrams of phase states of their binary combinations, Fourier transform infrared spectroscopy with - for the analysis of infrared spectra and rheological characteristics, including shear energy, Young's modulus, and yield strength.

In this study, individual fractions of beeswax were obtained using preparative flash chromatography with solvents permitted in the food industry (hexane, acetone, isopropyl alcohol).

Our studies made it possible to establish that individual fractions have differences in the morphological features of crystals, which have an important role in the structural formation. Their binary combinations form eutectic and monotectic mixtures, and in some cases - solid continuous solutions. Studies of rheological characteristics of oleogels based on individual fractions (wax esters, free fatty acids, and alcohols) have shown that the combination of wax esters both separately with fractions of fatty acids and with the addition of alcohols, contributes to the increase in shear energy, Young's modulus, and yield strength. Separation of beeswax by preparative flash chromatography allows obtaining fractions that are more effective structuring agents for food oleogels than native wax. The practical possibilities of creating an effective structuring agent from the mixture of wax esters, free fatty acids and alcohols are related to the process of directed enzymatic hydrolysis of native beeswax.

Grant: The research was carried out under a grant from the Russian Science Foundation (project No. 19-16-00113).

References

1. Kochetkova A.A., Sarkisyan V.A., Kodentsova V.M., Frolova Yu.V., Sobolev R.V. *Food oleogels: properties and prospects of their use // Food processing industry*. – 2019. №8. – P.30-35.
2. Singh A., Auzanneau F.-I., Rogers M.A. *Advances in edible oleogel technologies - A decade in review // Food Research International*. 2017. № 97. P.307-317.

УДК 579.2(22+66) DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-296-297

БИОДЕГРАДАЦИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ПОЧВЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ: БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И НЕРЕШЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ

Свиридов А. В., Шушкова Т. В., Эпиктетов Д. О., Тарлачков С. В., Ермакова И. Т., Леонтьевский А. А.

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им Г.К. Скрыбина РАН), Пушкино, Россия
 142290, Пушкино, пр-т. Науки, 5
 e-mail: alhummen@rambler.ru

Изучены особенности деградации устойчивых фосфорорганических загрязнителей у 8 почвенных бактериальных изолятов. Показаны различия в динамике утилизации таких соединений у таксономически близких штаммов, обладающих одинаковым набором ферментов катаболизма фосфонатов, что предполагает наличие неизвестных механизмов регуляции их активности

Ключевые слова: органофосфонаты, глифосат, биодegradация, биоремедиация, С-Р лиаза, фосфонатаза, бактерии-деструкторы.

Синтетические органофосфонаты (ОФ) – соединения с ковалентной связью углерод-фосфор (С-Р³⁺) – широко применяются как пестициды: так, объем производства гербицида глифосат (ГФ) составляет около 1 млн. тонн в год. ГФ и продукт его деградации аминометилфосфоновая кислота (АМФК) – устойчивые и опасные загрязнители окружающей среды, подверженные, однако, микробной деградации. Бактерии, в клетках которых присутствуют ферментные системы, расщепляющие С-Р связь с образованием ортофосфата (Pi), могут формировать эффективные ассоциации биодеградаторов ОФ в условиях почв и водоемов. [1].

Среди 40 чистых культур бактерий-деструкторов ОФ, выделенных из почв, загрязненных ГФ либо метилфосфоновой кислотой (МФК), отобрано 8 штаммов, способных эффективно минерализовать ГФ в жидких средах. Шесть изолятов относились к роду *Achromobacter*, 2 – к роду *Ochrobactrum*. При реинтродукции в почву в лабораторных условиях выделенные бактерии обеспечивали деструкцию от 7% до 93% биодоступного ГФ в течение 21 дня. Все изучаемые штаммы потребляли широкий спектр природных (2-аминоэтилфосфоновая кислота (2-АЭФ), фосфоноацетат, фосфономицин) и антропогенных ОФ-загрязнителей (МФК, АМФК, ГФ, фосфометил иминодиацетат). Обнаружение характерных метаболитов и изучение полногеномных сиквенсов указало на наличие у всех бактериальных культур С-Р лиазы, а также других ферментов катаболизма ОФ (ГФ-оксидоредуктаза, фосфонатаза, фосфоноацетатгидролаза). Для всех штаммов показана устойчивость к ГФ и АМФК и способность осуществлять перенос этих ОФ в цитоплазму, однако существенные различия в динамике потребления ГФ обнаруживались даже у представителей одной геногруппы в пределах вида. Ранее описанная адаптация бактериальной культуры к потреблению ГФ [2] наблюдалась также у штамма *A. aegrifaciens* Km 11. У всех культур, как требовавших, так и не требовавших первоначальной адаптации к потреблению ГФ, при поддержании на средах с гербицидом изменялись биодеградативные характеристики в отношении прочих ОФ (АМФК, 2-АЭФ, МФК и др.), вплоть до обратимого ингибирования потребления МФК у *O. anthropi* GPK 3. У *A. aegrifaciens* Km 11 и *A. insolitus* Kg 19 впервые показана индукция фосфонатазы при росте на среде с ГФ, что противоречит литературным данным о том, что экспрессия фермента активируется в ответ на недостаток Pi, либо в присутствии единственного субстрата фосфонатазного пути – 2-АЭФ.

Существование неизвестных факторов, определяющих эффективность деградации ОФ-загрязнителей бактериями и не сводящихся к наличию или отсутствию ферментов катаболизма ОФ, затрудняет оценку потенциала вновь выделяемых штаммов и разработку надежных технологий биоремедиации сред, загрязненных ОФ. Для решения этой проблемы требуется комплексный подход в рамках биохимии и биоинформатики, направленный на выявление механизмов адаптации бактерий к утилизации ОФ и принципов регуляции этих процессов.

Исследование фосфонатаз и полногеномное секвенирование проводилось при поддержке гранта РФФ 18-074-00021

Литература

- Zhan H., Feng Y., Fan X., Chen S. Recent advances in glyphosate biodegradation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. Vol. 102. № 12. P. 5033–5043.

2. Ermakova I. T., Shushkova T. V., Sviridov A. V., Zelenkova N. F., Vinokurova N. G., Baskunov B. P., Leontievsky A. A. Organophosphonates utilization by soil strains of *Ochrobactrum anthropi* and *Achromobacter* sp. // Arch. Microbiol. 2017. Vol. 199. № 5. P. 665–675.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-296-297

BIODEGRADATION OF PHOSPHORORGANIC POLLUTANTS BY SOIL BACTERIA: BIOCHEMICAL ASPECTS AND UNSOLVED PROBLEMS

Sviridov A. V., Shushkova T. V., Epiktetov D. O., Tarlachkov S. V., Ermakova I. T., Leontievsky A. A.

PSCBR RAS G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino, Russia
142290 5 Nauki prospect, Pushchino, Russia
e-mail: alhummen@rambler.ru

Biodegradation of stable organophosphorus (OP) pollutants was studied in 8 soil bacterial isolates. Differences in OP uptake dynamics in closely related strains possessing the same set of OP-catabolizing enzymes were discovered. This suggests the existence of unknown mechanisms of regulation of these processes.

Key words: organophosphonates, glyphosate, biodegradation, bioremediation, C-P lyase, phosphonate, degrading bacteria.

Synthetic organophosphonates (OP) are the compounds which contain covalent carbon-phosphorus (C–P³⁺) bond in their structure. OP are widely used as pesticides, e. g. annual amount of production of ubiquitous herbicide glyphosate (GP) totals 1 million tons. While GP and its primary product of degradation aminomethylphosphonate (AMPA) are stable pollutants with high environmental risk, they are still subject to microbial decomposition. Bacteria possessing specific enzyme system capable of disrupting the C–P bond may form efficient OP-degrading communities in soil and water bodies [1].

Eight bacterial strains capable of efficient mineralization of GP in liquid media were selected out of 40 OP-degrading cultures previously isolated from soils polluted either with GP or with methylphosphonic acid (MPA). Six isolates belonged to genus *Achromobacter*, while 2 were of genus *Ochrobactrum*. Selected cultures were capable of 7% to 93% GP depletion in 21 days after introduction in soil under laboratory conditions. All studied bacteria utilized a wide array of natural (2-aminoethylphosphonic acid (2-AEP), phosphonoacetic acid, phosphomycin) and synthetic (MPA, AMPA, GP, phosphonomethyl iminodiacetate) phosphonates. Our studies of complete genome sequences and identification of specific metabolites indicate that every strain possessed the pivotal system of OP decomposition known as “C–P lyase”, as well as other enzymes involved in these processes (GP-oxidoreductase, phosphonate, phosphonoacetate hydrolase). While all studied bacteria were tolerant to GP and AMPA and were able to transport these compounds into the cytoplasm, we observed significant differences in GP uptake dynamics even among strains that belonged to single genogroup within single species. The phenomenon of adaptation of bacterial culture to GP utilization which was described before [2] was also observed in *A. aegrifaciens* Km 11 strain. Both the cultures that required preadaptation to GP consumption and those that did not demonstrated changes in their degrading characteristics in respect to other OP (AMPA, 2-AEP, MPA etc.) when maintained on media with GP. Maximum effect was observed in *O. anthropi* GPK 3 which showed complete but reversible inhibition of its MPA uptake. Specific induction of phosphonate was discovered in *A. aegrifaciens* Km 11 and *A. insolitus* Kg 19 grown on media with GP, which contradicts with existing data that phosphonate expression is activated either under phosphate starvation or in presence of its natural substrate 2-AEP.

Existence of uninvestigated factors which affect OP degradation in bacteria and are not limited to the matter of presence of enzymes of OP catabolism per se may cause difficulties in application of laboratory strains for biotechnological purposes and in estimation of biodegrading capabilities of novel isolates. New approach with emphasis on biochemistry and bioinformatics is necessary to reveal mechanisms of bacterial adaptation to OP consumption and for eventual development of reliable techniques of GP and AMPA cleanup.

Studies of phosphonate and genome sequencing were supported by Russian Science Foundation grant 18-074-00021

References

1. Zhan H., Feng Y., Fan X., Chen S. Recent advances in glyphosate biodegradation // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018. Vol. 102. № 12. P. 5033–5043.
2. Ermakova I. T., Shushkova T. V., Sviridov A. V., Zelenkova N. F., Vinokurova N. G., Baskunov B. P., Leontievsky A. A. Organophosphonates utilization by soil strains of *Ochrobactrum anthropi* and *Achromobacter* sp. // Arch. Microbiol. 2017. Vol. 199. № 5. P. 665–675.

УДК 577.152.34 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-298-299

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ МИКРОМИЦЕТЫ, ПЕРСПЕКТИВНЫЕ В БИОДЕГРАДАЦИИ ОТХОДОВ ЖИВОТНОВОДСТВА

Тиморшина С.Н., Попова Е.А., Осмоловский А.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1
 e-mail: timorshina.svetlana@mail.ru

Проведен скрининг среди микромицетов рода *Aspergillus* на возможность секреции протеаз с биотехнологически значимыми активностями – кератинолитической и коллагенолитической. Показано, что *A. giganteus* и *A. ustus* могут быть использованы в качестве продуцентов протеаз, перспективных в биодеградация отходов животноводства.

Ключевые слова: протеазы, микромицеты, кератинолиз, коллагенолиз, биодегградация отходов животноводства, биотехнология

Гидролиз труднорастворимых фибриллярных белков – это актуальная проблема современной энзимобиотехнологии, решение которой необходимо для перехода к высокоэффективной и экологически чистой переработке отходов животноводства и вторичному использованию продуктов этой переработки в качестве удобрений, кормовых добавок, а также компонентов косметических и медицинских препаратов. Фибриллярные белки, такие как кератин и коллаген, составляют основную часть многих биологических отходов, включающих костно-хрящевую массу, а также эпидермис и его производные (прежде всего перья и шерсть). Такие отходы являются серьезным фактором загрязнения и замусоривания окружающей среды, поэтому разработка эффективного метода биодегградации фибриллярных белков – важное направление современной экологической биотехнологии [1].

Очевидно, что наиболее перспективными источниками протеаз являются микро-организмы, секретирующие ферменты и метаболизм которых хорошо контролируем. Среди микроорганизмов, способных гидролизировать труднорастворимые белковые субстраты, наибольший интерес представляют микроскопические грибы рода *Aspergillus*, так как они известные продуценты внеклеточных протеазных комплексов с широкой субстратной специфичностью действия [2]. В связи с этим, был проведен первичный скрининг среди мицелиальных грибов рода *Aspergillus* с использованием агаризованных сред, содержащих один из белковых субстратов: казеин, желатин, кератин. Значения энзиматических индексов (EI) культур были определены путем измерения зон гидролиза на этих средах. *A. giganteus* и *A. ustus* показали наибольшие значения EI на средах с кератином и желатином, соответственно, в совокупности с высокой казеинолитической активностью, что позволило сделать предположение о перспективности этих культур в качестве продуцентов промышленно значимых протеаз. На следующем этапе исследования, отобранные микромицеты культивировали в жидких средах с различными источниками азота (органическими, минеральными и смешанными), а культуральную жидкость использовали для количественного анализа протеолитической активности. Реакции проводили с использованием суспензий нативных и окрашенных белков (казеина, кератина и азоколлы), количество продукта измеряли спектрофотометрически. Изучение динамики накопления протеаз выявило, что максимумы активности культур наступали при культивировании продуцентов на разных средах. Наибольшая коллагенолитическая активность ($143,99 E_{\text{АзК}}$) достигалась при культивировании *A. ustus* на 5 сутки на среде с добавлением гидролизата рыбной муки. А максимум кератинолитической активности ($18,53 E_{\text{Кер}}$) был показан на 4 сутки культивирования *A. giganteus* на среде с перьевой мукой. Полученные результаты указывают на разные механизмы секреции протеаз, гидролизующих фибриллярные белки: конститутивный и индуцибельный, что может быть интересно при решении различных биотехнологических задач.

Таким образом, совмещая микробиологические и биохимические подходы, была показана возможность использования мицелиальных грибов в качестве продуцентов протеолитических ферментов, которые могут сделать переработку сельскохозяйственных отходов более экологически чистой и экономической выгодной, за счет производства продуктов с высокой добавленной стоимостью.

Литература

1. Hassan M.A., Abol-Fotouh D., Omer A.M., Tamer T.M., Abbas E. Comprehensive insights into microbial keratinases and their implication in various biotechnological and industrial sectors: A review // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Vol. 154. P. 567-583.
2. De Souza P.M., Bittencourt M.L., Caprara C.C. A biotechnology perspective of fungal proteases // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2015. Vol. 46. № 2. P. 337-346.

УДК 577.152.34 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-298-299

PROTEOLYTICALLY ACTIVE MICROMYCETES, PROMISING IN THE BIODEGRADATION OF LIVESTOCK WASTE

Timorshina S.N., Popova E.A., Osmolovskiy A.A.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119991, Moscow, Leninskie Gory, 1
e-mail: timorshina.svetlana@mail.ru

A screening was carried out among micromycetes of the genus *Aspergillus* for the possibility of secreting proteases with biotechnologically significant activities - keratinolytic and collagenolytic. *A. giganteus* and *A. ustus* can be used as producers of proteases that are promising for the biodegradation of animal waste.

Key words: proteases, micromycetes, keratinolysis, collagenolysis, biodegradation of animal waste, biotechnology

Hydrolysis of hard-to-degrade fibrillar proteins is an urgent problem of modern enzyme biotechnology, the solution of which is necessary for the transition to a highly efficient and environmentally friendly processing of livestock waste and the secondary use of the products of this process as fertilizers, feed additives, as well as components of cosmetic and medical preparations. Fibrillar proteins such as keratin and collagen constitute the bulk of many biological wastes, which include bone and cartilage mass and epidermis and its derivatives (primarily feathers and wool). Such waste is a serious factor of environmental pollution and littering, therefore the search for an effective method of biodegradation of fibrillar proteins is an important direction of modern environmental biotechnology [1].

Obviously, the most promising sources of proteases are microorganisms that secrete enzymes into the environment and whose metabolism is well controlled. Among microorganisms that could hydrolyze hard-to-degrade protein substrates, the most interesting are micromycetes, including microscopic fungi of the genus *Aspergillus*, since they are known producers of extracellular protease complexes with broad substrate specificity [2]. Therefore, primary screening was conducted on filamentous fungi of the genus *Aspergillus* using agar media containing one of the protein substrates – casein, gelatin, keratin. The values of enzymatic indices (EI) of the cultures were determined by the size of the hydrolysis zones on these media. *A. giganteus* and *A. ustus* showed the highest EI value on keratin and gelatin medium respectively in combination with high activity against casein, which made it possible to suggest that these cultures are promising producers of industrially significant proteases. At the next stage of research, these micromycetes were cultivated in liquid media with various sources of nitrogen (organic, mineral and mixed) and the culture fluid was used for the quantitative analysis of proteolytic activity. The reactions were carried out with suspensions of native and azo-dyed proteins (casein, keratin, azocoll), the amount of the product was identified spectrophotometrically. Study of the accumulate dynamics of proteases established that activity maxima are reached by cultivating producers on different media. The highest collagenolytic activity (143,99 U_{AzC}) is achieved by cultivated *A. ustus* on the 5th day on the medium with the addition of a hydrolyzate of fish meal. And the maximum keratinolytic activity (18,53 U_{Ker}) is shown on the 4th day by cultivated *A. giganteus* on medium with feather meal. These data indicate various mechanisms of secretion of proteases active against fibrillar proteins: constitutive and inducible, which may be interesting in solving various biotechnological problems.

Thus, combining microbiological and biochemical approaches, it was demonstrated that filamentous fungi can be used as producers of proteolytic enzymes, which will make the recycle of agricultural waste more environmentally friendly and cost-effective by producing value-added products.

References

1. Hassan M.A., Abol-Fotouh D., Omer A.M., Tamer T.M., Abbas E. Comprehensive insights into microbial keratinases and their implication in various biotechnological and industrial sectors: A review // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Vol. 154. P. 567-583.
2. De Souza P.M., Bittencourt M.L., Caprara C.C. A biotechnology perspective of fungal proteases // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2015. Vol. 46. № 2. P. 337-346.

УДК 544/42+577.15 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-300-301

НЕЙРОЭНЗИМОЛОГИЯ. МЕХАНИЗМ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ХОЛИНЕРГИЧЕСКОМ СИНАПСЕ

Варфоломеев С.Д., Быков В.И., Цыбенкова С.Б.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия
 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4
 e-mail: tsybenova@mail.ru

Предложена и исследована кинетическая модель, описывающая динамику синаптического “разряда” с учетом кинетики инъекции нейромедиатора в синаптическую щель, pH-зависимости каталитической активности фермента и диффузионного вывода протонов.

Ключевые слова: кинетическая модель, динамика процесса, холинергический синапс, синаптическая щель, ацетилхолинэстераза, ацетилхолин, нервно-мышечное сокращение, ботулинический токсин, болезнь Альцгеймера.

Принципиально важную многофункциональную роль в нейронных сетях играют процессы на основе нейромедиатора ацетилхолина (холинергические синапсы). Межклеточные контакты синаптической природы осуществляются путем введения (механического впрыскивания) везикул, наполненных ацетилхолином в гелиевую среду синаптической щели, насыщенную высокой концентрацией ацетилхолинэстеразы, гидролизующей ацетилхолин с образованием холина и уксусной кислоты. Ацетилхолин преодолевает гидролитический барьер ацетилхолинэстеразы, достигает постсинаптической мембраны, связывается с ацетилхолиновыми рецепторами, действие которых вызывает передачу электрического возбуждения другому нейрону или мышце [1]. Холинергический синапс играет роль “химического полупроводника”, реализующего направленную передачу возбуждения от пресинаптической мембраны клетки донора медиатора к постсинаптической мембране возбуждаемого клетки-партнера.

В работе предложена кинетическая модель, описывающая динамику синаптического “разряда” с учетом кинетики инъекции нейромедиатора в синаптическую щель, скорости его ферментативного гидролиза, pH-зависимости каталитической активности фермента, ингибирования фермента ионами водорода и избытком субстрата, диссипативного рассеивания и нейтрализации ионов водорода. При кинетическом описании холинергического импульса наибольшая неопределенность связана с величиной концентрации ацетилхолинэстеразы в синаптической щели и параметром, характеризующим диссипацию и поглощение продуцируемых гидролизом ацетилхолина ионов водорода. Кинетическое моделирование позволяет проварьировать эти параметры в широком диапазоне, и получить описание теоретически возможных случаев. Результаты расчетов показывают строгую корреляцию продолжительности импульса ионов водорода со временем гидролиза ацетилхолина [2]. В рамках рассматриваемой модели выделены следующие управляющие параметры: концентрация фермента (ацетилхолинэстеразы), частота передачи импульсов, скорость инъекции ацетилхолина в синаптическую щель, инъектируемая концентрация ацетилхолина (нейромедиатора – субстрата), скорость диссипативного вывода из синаптической щели ионов водорода.

Математическое моделирование позволяет на качественном уровне объяснять ряд физиологических феноменов, связанных с холинергической передачей.

Предложенная кинетическая модель достаточно адекватно позволяет описать кинетическое поведение холинергических синапсов и ряд физиологических феноменов: отравление нервно-паралитическими ядами, нервно-мышечный паралич, применение токсина Botox при лечении инсультных параличей, механизм записи и хранения информации в нейробиологической памяти, болезнь Альцгеймера [3]. Эта кинетическая модель может быть названа базовой, поскольку позволяет описывать основные процессы функционирования холинергического синапса. В дальнейшем ее можно детализировать и расширять.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант №18–13–00030).

Литература

1. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.Н. Рецепторы физиологически активных веществ. Волгоград: Семь ветров, 1999. 640 с.
2. Варфоломеев С.Д., Быков В.И., Цыбенкова С.Б. Кинетика химических процессов в мозге человека. Протонная блокада ацетилхолинэстеразы и pH-импульс в механизме функционирования холинергического синапса // ДАН. – 2020. – Т. 491. – С. 189–193.

3. Варфоломеев С.Д., Быков В.И., Цыбенкова С.Б. Кинетика химических процессов в мозге человека. Холинергический синапс – механизмы функционирования и методы управления //ДАН. – 2020. – Т. 492. – С. 305–309.

UDC 544/4+577.15 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-300-301

NEUROENZYMOLOGY. MECHANISM OF ACETYLCHOLINESTERASE FUNCTIONING IN CHOLINERGIC SYNAPSE

Varfolomeev S.D., Bykov V.I., Tsybenova S.B.

Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia
119334, Moscow, ul. Kosygina, 4
e-mail: tsybenova@mail.ru

A kinetic model describing the dynamics of synaptic "discharge" taking into account the kinetics of neurotransmitter release into a synaptic cleft, pH-dependence of the enzyme catalytic activity and diffusion proton removal has been proposed and studied.

Key words: kinetic model, process dynamics, cholinergic synapse, synaptic cleft, acetylcholinesterase, neuromuscular contraction, botulinum toxin, Alzheimer's disease

Processes based on the acetylcholine neurotransmitter (cholinergic synapses) play a fundamentally important multifunctional role in neural networks. Intercellular contacts of synaptic nature are carried out by the introduction (mechanical injection) of vesicles filled with acetylcholine in the helium medium of the synaptic cleft, which is saturated with a high concentration of acetylcholinesterase. Acetylcholinesterase hydrolyzes the acetylcholine to form choline and acetic acid. Acetylcholine overcomes the hydrolytic barrier of acetylcholinesterase, reaches the postsynaptic membrane, binds to acetylcholine receptors, the action of which causes the transfer of electrical excitation to another neuron or muscle [1]. The cholinergic synapse plays the role of "chemical semiconductor", which implements the directed transfer of excitation from the presynaptic membrane of the mediator cell donor to the postsynaptic membrane of the excited partner cell.

In this work a kinetic model describing the dynamics of synaptic "discharge" taking into account the kinetics of neurotransmitter injection into a synaptic cleft, the rate of its enzymatic hydrolysis, pH-dependence of the enzyme catalytic activity, inhibition of the enzyme by hydrogen ions and excess substrate, dissipative dispersion and hydrogen ion neutralization is proposed. In kinetic description of cholinergic impulse the most uncertainty is related to the value of acetylcholinesterase concentration in synaptic cleft and the parameter characterizing dissipation and absorption of hydrogen ions produced by hydrolysis of acetylcholine. The kinetic modelling allows to vary these parameters in a wide range, and to receive the description of theoretically possible cases. The results of the calculations show a strict correlation between the pulse duration of hydrogen ions and the time of acetylcholine hydrolysis [2]. Within of considered model, the following control parameters have been identified: the concentration of the enzyme (acetylcholinesterase), pulse transfer frequency, the injection rate of acetylcholine into the synaptic cleft, the injected concentration of acetylcholine (neurotransmitter - substrate), the rate of dissipative removal of hydrogen ions from the synaptic cleft.

Mathematical modeling allows to explain a number of physiological phenomena connected with cholinergic transmission on a qualitative level.

The proposed kinetic model adequately enough allows to describe kinetic behavior of cholinergic synapses and a number of physiological phenomena such as a nerve agent poisoning, neuromuscular paralysis, use of Botox toxin in treatment of stroke paralysis, mechanism of information recording and storage in neurological memory, Alzheimer's disease [3]. The kinetic model can be called a basic one, as it allows to describe the main processes of functioning of a cholinergic synapse. Further the model can be detailed and expanded.

This study was supported by the Russian Science Foundation [Grant Number 18-13-00030].

References

1. Sergeev PV, Shimanovskij NL, Petrov VN. Receptory fiziologicheski aktivnyh veshhestv. 2-e izd. Volgograd: Sem' vetrov; 1999 (in Russ).
2. Varfolomeev S.D., Bykov V.I., Tsybenova S.B. Kinetics of chemical processes in the human brain. Proton blockade of acetylcholinesterase and pH-impulse in the mechanism of functioning of the cholinergic synapse // Doklady AN. – 2020. – Vol. 491. – P. 189–193.
3. Varfolomeev S.D., Bykov V.I., Tsybenova S.B. Kinetics of chemical processes in the human brain. The cholinergic synapse - mechanisms of functioning and control methods // Doklady AN. – 2020. – Vol. 492. – P. 305–309.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЙ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ: ЗАКОНОМЕРНОСТИ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

BIOLOGICAL TRANSFORMATIONS OF CONTAMINANTS IN THE NATURAL ENVIRONMENT: PATTERNS AND PRACTICAL ASPECTS

Руководитель

Н.Б. Градова профессор, д.б.н., кафедра биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева /

N.B. Gradova professor, grand PhD (Biology), sub-Department of Biotechnology, Mendeleev Russian University of Chemical Technology

| | |
|--|-----|
| 1. ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ АКТИВНЫХ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЕГРАДИРОВАТЬ НЕФТЬ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ NaCl Айткельдиева С.А., Файзулина Э.Р., Ауэзова О.Н., Татаркина Л.Г., Алимбетова А.В., Спанкулова Г.А. | 304 |
| STUDYING THE ABILITY OF ACTIVE THERMOTOLERANT OIL-OXIDIZING MICROORGANISMS TO DISPOSE OIL AT THE INCREASED CONCENTRATIONS OF NaCl Aitkeldiyeva S.A., Faizulina E.R., Auezova O.N., Tatarkina L.G., Alimbetova A.V., Spankulova G.A. | 305 |
| 2. ЭКСПРЕССНЫЕ МЕТОДЫ БЕСПРИБОРНОЙ ДЕТЕКЦИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ, ОСНОВАННЫЕ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ КОМПЛЕКСОВ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА С ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ Берлина А.Н., Комова Н.С., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. | 306 |
| EXPRESS METHODS OF NON-INSTRUMENT DETECTION OF HEAVY METALS BASED ON GOLD NANOPARTICLE COMPLEXES WITH OLIGONUCLEOTIDES Berlina A.N., Komova N.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. | 307 |
| 3. ГЕОХИМИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И ЕЕ ЗНАЧЕНИЕ В РАЗВИТИИ СОВРЕМЕННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ Градова Н.Б., Ермаков В.В., Ковальский Ю.В. | 308 |
| GEOCHEMICAL ECOLOGY OF MICROORGANISMS AND ITS SIGNIFICANCE IN DEVELOPMENT OF NOWADAY BIOTECHNOLOGIES Gradova N.B., Ermakov V.V., Kovalsky Yu.V. | 309 |
| 4. ШТАММ GORDONIA SP. 135 – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ДЕСТРУКТОР ДИБЕНЗОТИОФЕНА Делеган Я.А., Ветрова А.А. | 310 |
| THE STRAIN GORDONIA SP. 135 – PROMISING DIBENZOTHIOPHENE DEGRADER Y. Delegan, A. Vetrova | 311 |
| 5. НОВЫЕ ШТАММЫ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ Франк Ю.А., Тыщенко Н.В., Ивасенко Д.А., Косов А.В., Рыбкин Д.С., Лукьянова Е.А., Герасимчук А.Л. | 311 |
| NOVEL STRAINS OF MICROORGANISMS DEGRADING PETROLEUM HYDROCARBONS Frank Y.A., Tyschenko N.V., Ivassenko D.A., Kosov A.V., Rybkin D.S., Lukjanova E.A., Gerasimchuk A.L. | 312 |
| 6. ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ ХЕЛАТОВ С БЕЛКОМ В ТЕСТ-ПОЛОСКАХ ДЛЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ИОНОВ РТУТИ Комова Н.С., Берлина А.Н., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. | 313 |
| APPLICATION OF SULFUR-CONTAINING CHELATES COMPLEXES WITH PROTEINS FOR HIGH-SENSITIVE DETECTION OF HEAVY METALS Komova N.S., Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. | 313 |
| 7. СОЗДАНИЕ БИОКОМПЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ЛИКВИДАЦИИ АВАРИЙНЫХ РАЗЛИВОВ НЕФТИ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ НА ПОВЕРХНОСТИ МИКРОКАПСУЛ Николаев Ю.А., Борзенков И.А., Лойко Н.Г., Иванова А.Е., Канапачкий Т.А., Демкина Е.В., Карабашев С.Г., Близнац И.В., Эль-Регистан Г.И. | 314 |
| CREATION OF BIOCOMPOSITE MATERIALS FOR OIL SPILL RESPONSE BASED ON THE IMMOBILIZATION OF HYDROCARBON-OXIDIZING BACTERIA ON THE SURFACE OF MICROCAPSULES Nikolaev Yu.A., Borzenkov I.A., Loyko N.G., Ivanova A.E., Kanapatsky T.A., Demkina E.V., Karabashev S.G., Bliznetc I.V., El-Registan G.I. | 315 |

| | |
|---|-----|
| 8. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПСИХРОФИЛЬНОГО ШТАММА FUSARIUM OXYSPORUM ДЛЯ ОЧИСТКИ ЦИАНИДСОДЕРЖАЩИХ ПРОМЫШЛЕННЫХ ОБОРОТНЫХ ВОД | |
| Павлов И.Н., Литовка Ю.А., Петренко С.М., Эназаров Р.Х. | 316 |
| PSYCHROPHILIC STRAIN FUSARIUM OXYSPORUM – PROSPECTS FOR THE USE FOR BIODEGRADATION OF CYANIDES IN INDUSTRIAL CIRCULATING WATERS | |
| Pavlov I.N., Litovka Yu.A., Petrenko S.M., Enazarov R.Kh. | 317 |
| 9. УПРАВЛЕНИЕ ПРОЦЕССОМ АНАММОКС НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА МЕТАГЕНОМА АКТИВНОГО ИЛА АНАММОКС | |
| Пименов Н.В., Марданов А.В., Равин Н.В., Каллистова А.Ю., Грачев В.А., Берестовская Ю.Ю., Николаев Ю.А. | 318 |
| ANAMMOX PROCESS CONTROL BASED ON ANALYSIS OF ANAMMOX ACTIVATED SLUDGE METAGENOME | |
| Pimenov N.V., Mardanov A.V., Ravin N.V., Callistova A.Yu., Grachev V.A., Berestovskaya Yu.Yu., Nikolaev Yu.A. | 319 |
| 10. БИОЭКОНОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ КВАНТОВОЙ БЛОКЧЕЙН-СТЕГАНОГРАФИИ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА И ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЙ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ В РЕГИОНАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕСПИЛОТНЫХ КОМПЛЕКСОВ И ПИЛОТИРУЕМЫХ СИСТЕМ | |
| Л.С. Раткин..... | 321 |
| BIOLOGICAL ECONOMICAL ASPECTS OF USAGE OF QUANTUM BLOCKCHAIN-STEGANOGRAPHY FOR ECOLOGICAL MONITORING AND PREVENTION OF REGIONAL ENVIRONMENTAL POLLUTION WITH THE APPLICATIONS OF UNMANNED COMPLEXES AND PILOTED SYSTEMS | |
| L. Rathkeen..... | 322 |
| 11. ПОДБОР КОНСОРЦИУМОВ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ МОНОАРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ | |
| Файзулина Э.Р., Айткельдиева С.А., Татаркина Л.Г., Алимбетова А.В., Ауэзова О.Н., Спанкулова Г.А. | 323 |
| SELECTION OF CONSORTIA OF MICROORGANISMS-DESTRUCTORS OF MONOAROMATIC HYDROCARBONS | |
| Faizulina E.R., Aitkeldiyeva S.A., Tatarkina L.G., Alimbetova A.V., Auezova O.N., Spankulova G.A. | 324 |
| 12. ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МУТАНТНОГО ШТАММА RAD2ΔHSM3Δ ДРОЖЖЕЙ SACCHAROMYCES CEREVISIAE К МЕТИЛМЕТАНСУЛЬФОНАТУ | |
| Федоров А.А., Алексеева Е.А., Королев В.Г. | 325 |
| STUDY OF SENSITIVITY OF MUTANT STRAIN RAD2ΔHSM3Δ YEAST SACCHAROMYCES CEREVISIAE TO METHYLMETHANESULPHONATE | |
| Fedorov A.A., Alekseeva E.A., Korolev V.G. | 327 |
| 13. БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ОЧИСТКИ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ОТ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ В УСЛОВИЯХ УМЕРЕННОГО И ХОЛОДНОГО КЛИМАТА | |
| Филонов А.Е., Пунтус И.Ф., Ахметов Л.И., Ветрова А.А., Линников С. В., Боронин А.М. | 328 |
| BIOTECHNOLOGIES AND BIOPREPARATIONS FOR CLEANING THE ENVIRONMENT FROM OIL POLLUTIONS IN TEMPERATE AND COLD CLIMATES | |
| Filonov A.E., Puntus I.F., Akhmetov L.I., Vetrova A.A., Linnikov S.V., Boronin A.M. | 329 |
| 14. СКРИНИНГ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ КОРМОВЫХ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ НА ОТХОДАХ МАСЛЕНИЧНОГО ПРОИЗВОДСТВА | |
| И.А. Фоменко, Т.П. Кузьмичева, И.Д. Бельский. | 330 |
| SCREENING OF MYCELIAL FUNGI AS POTENTIAL PRODUCERS OF FODDER CELLULOLYTIC ENZYMES ON WASTE OIL PRODUCTION | |
| I.A. Fomenko, T.P. Kuzmicheva, I.D. Belsky. | 331 |
| 15. КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ – АКТИВАТОРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ АКТИВНОГО ИЛА | |
| Чурмасова Л. А., Шаненко Е. Ф., Мухамеджанова Т. Г., Веселков К. А., Константинова А. С., Рыжова О. Г. | 332 |
| ORGANOSILICON COMPOUNDS – PROMOTER OF ACTIVATED SLUDGE MICROORGANISMS. | |
| Churmasova L.A. Shanenko E.F., Mukhamedzhanova T.G., Veselkov K.A., Konstantinova A.S, Ryzhova O. G. | 333 |

УДК 579.66 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-304-306

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ АКТИВНЫХ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЕГРАДИРОВАТЬ НЕФТЬ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ NaCl

Айткельдиева С.А., Файзулина Э.Р., Ауэзова О.Н., Татаркина Л.Г., Алимбетова А.В., Спанкулова Г.А.

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан
050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 105
ecomicrolab@gmail.com

Изучена способность термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов деградировать нефть при повышенных концентрациях NaCl. Показано, что исследуемые штаммы способны к деструкции нефти в этих условиях, а на ее степень влияет температурный фактор.

Ключевые слова: нефтяное загрязнение, деструкция нефти, термотолерантные нефтеокисляющие микроорганизмы, засоленность

Одной из главных проблем ремедиации территорий в условиях жаркого климата является быстрое испарение воды из грунта, что приводит к его засолению. Поэтому перспективными агентами очистки нефтезагрязненных почв в регионах Казахстана являются микроорганизмы, устойчивые к повышенному содержанию солей. Известно, что на нефтепромыслах Казахстана почвогрунты засолены в разной степени. В связи с этим изучалась способность отобранных термотолерантных нефтеокисляющих бактерий утилизировать нефть м. Жанаталап при повышенных температурах и различных концентрациях NaCl (3%, 5%, 10%).

Ранее из нефтезагрязненных почв Западного Казахстана были выделены микроорганизмы, способные окислять углеводороды нефти при различных температурах. Изучение морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств, а также молекулярно-генетическая идентификация микроорганизмов показала, что они относятся к родам *Bacillus*, *Gordonia*, *Pseudomonas* и *Achromobacter*.

Изучение количественного потребления нефти в жидкой минеральной среде показало, что при 35оС из шести исследуемых культур четыре проявляли высокую активность – К-3, 4/5, 22ПК, П1-35-14 при всех исследуемых концентрациях соли (таблица 1). С увеличением концентрации соли заметное снижение активности было отмечено у штамма 4/5. У культур К-3 и 22ПК происходило незначительное снижение активности, а у культуры П1-35-14 при всех концентрациях степень деструкции нефти оставалась практически на одном уровне и составляла 73,6-75,7%. При температуре 40оС исследовались четыре культуры микроорганизмов, и среди них наибольшую активность проявил штамм ИП-40-4. Остальные культуры были менее активны. Следует отметить, что при повышении температуры на 5оС штамм К-3 резко снизил свою деструкционную способность. При температуре 50°С в присутствии в среде 3% NaCl деструкция нефти составляла 26,3-45,7%, при 5% - 38,7-51,4%, при 10% - 38,6-40,3%. У четырех культур К-3, 72, КВ-36, П2-50-2 способность к деструкции нефти была примерно на одном уровне при всех концентрациях. Только у штамма П2-50-5 при увеличении концентрации соли до 5% способность к деградации нефти резко возросла и составила 51,4%. При 10%-ном содержании NaCl все исследуемые штаммы утилизировали нефть практически на одном уровне.

Таблица 1. Деструкция нефти активными штаммами термотолерантных бактерий при разных концентрациях NaCl

| Штамм | Степень деструкции нефти, % | | |
|----------|-----------------------------|---------|----------|
| | 3% NaCl | 5% NaCl | 10% NaCl |
| 35°С | | | |
| К-3 | 85,9 | 81,3 | 73,6 |
| 4/5 | 91,1 | 65,4 | 62,7 |
| 22ПК | 70,7 | 64,3 | 61,6 |
| П1-35-2 | 31,0 | 35,9 | 32,5 |
| П1-35-14 | 74,9 | 75,7 | 73,6 |
| П2-35-9 | 34,9 | 45,1 | 27,1 |
| контроль | 15,2 | 15,9 | 15,5 |

Таблица 1. Продолжение

| 40°C | | | |
|----------|------|------|------|
| К-3 | 39,5 | 32,8 | 40,6 |
| 25Ш | 42,6 | 43,2 | 36,8 |
| ИП-40-4 | 51,2 | 41,4 | 47,4 |
| П1-40-8 | 38,9 | 39,0 | 39,0 |
| контроль | 15,3 | 15,9 | 16,4 |
| 50°C | | | |
| К-3 | 41,1 | 39,0 | 40,3 |
| 72 | 43,3 | 38,9 | 38,8 |
| КВ-36 | 45,7 | 41,2 | 38,6 |
| П2-50-2 | 36,1 | 38,7 | 38,6 |
| П2-50-5 | 26,3 | 51,4 | 38,8 |
| контроль | 16,2 | 16,4 | 16,5 |

Таким образом, изучение галотолерантности отобранных штаммов показало, что все они способны расти и деградировать нефть при повышенном содержании NaCl. При этом на степень деструкции нефти влиял температурный фактор. Самый высокий процент утилизации нефти был при 35°C.

Работа выполнена в рамках проекта № AP05132128 при финансировании МОН РК.

UDC 579.66 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-304-306

STUDYING THE ABILITY OF ACTIVE THERMOTOLERANT OIL-OXIDIZING MICROORGANISMS TO DISPOSE OIL AT THE INCREASED CONCENTRATIONS OF NaCl

Aitkeldiyeva S.A., Faizulina E.R., Auezova O.N., Tatarkina L.G., Alimbetova A.V., Spankulova G.A.

LLC «Research and Production Center for Microbiology and Virology», Almaty, Kazakhstan
050010, Almaty, Bogenbay batyr str., 105
e-mail: ecomicrolab@gmail.com

The ability of thermotolerant oil-oxidizing microorganisms to degrade oil at elevated concentrations of NaCl has been studied. It was shown that the studied strains were capable of oil degradation under these conditions, and the temperature factor affects its degree.

Key words: oil pollution, oil destruction, thermotolerant oil-oxidizing microorganisms, salinity

One of the main problems of remediation of territories in hot climates is the rapid evaporation of water from the soil, which leads to its salinization. Therefore, microorganisms resistant to high salt content are promising agents for cleaning oil-contaminated soils in the regions of Kazakhstan. It is known that in the oil fields of Kazakhstan, soil is saline to varying degrees. In this regard, the ability of the selected thermotolerant oil-oxidizing bacteria to utilize oil of the Zhanatalap oil field at elevated temperatures and various concentrations of NaCl (3, 5 and 10%) was studied.

Earlier, microorganisms capable of oxidizing oil hydrocarbons at various temperatures were isolated from oil-contaminated soils in Western Kazakhstan. The study of morphological, cultural and physiological and biochemical properties, as well as molecular genetic identification of microorganisms showed that they belonged to the genera *Bacillus*, *Gordonia*, *Pseudomonas* and *Achromobacter*.

A study of the quantitative consumption of oil in a liquid mineral medium showed that at 35°C out of the six studied cultures, four showed high activity - K-3, 4/5, 22PK, P1-35-14 at all studied salt concentrations (table 1). The most noticeable decrease in activity with increasing salt concentration was observed in strain 4/5. In K-3 and 22PK cultures, there was a slight decrease in activity, and in P1-35-14 culture at all concentrations, the degree of oil destruction remained almost at the same level and amounted to 73.6-75.7%. At a temperature of 40°C, four cultures of microorganisms were studied, and among them, the strain IP-40-4 was the most active. The rest of the cultures were less active. It should be

noted that with an increase in temperature by 5°C, strain K-3 sharply reduced its destruction ability. At a temperature of 50°C in the presence of 3% NaCl in the medium, the destruction of oil was 26.3-45.7%, at 5% - 38.7-51.4%, at 10% - 38.6-40.3%. In four cultures K-3, 72, KV-36, P2-50-2, the ability to oil destruction was approximately at the same level at all concentrations. Only in strain P2-50-5 the ability to degrade oil increased sharply with an increase in salt concentration to 5% and amounted to 51.4%. At 10% NaCl content, all the studied strains utilized oil at almost the same level.

Table 1. Oil destruction by active strains of thermotolerant bacteria at different concentrations of NaCl

| Strain | The degree of oil destruction, % | | |
|----------|----------------------------------|---------|----------|
| | 3% NaCl | 5% NaCl | 10% NaCl |
| 35°C | | | |
| K-3 | 85,9 | 81,3 | 73,6 |
| 4/5 | 91,1 | 65,4 | 62,7 |
| 22PK | 70,7 | 64,3 | 61,6 |
| P1-35-2 | 31,0 | 35,9 | 32,5 |
| P1-35-14 | 74,9 | 75,7 | 73,6 |
| P2-35-9 | 34,9 | 45,1 | 27,1 |
| control | 15,2 | 15,9 | 15,5 |
| 40°C | | | |
| K-3 | 39,5 | 32,8 | 40,6 |
| 25Sh | 42,6 | 43,2 | 36,8 |
| IP-40-4 | 51,2 | 41,4 | 47,4 |
| P1-40-8 | 38,9 | 39,0 | 39,0 |
| control | 15,3 | 15,9 | 16,4 |
| 50°C | | | |
| K-3 | 41,1 | 39,0 | 40,3 |
| 72 | 43,3 | 38,9 | 38,8 |
| KV-36 | 45,7 | 41,2 | 38,6 |
| P2-50-2 | 36,1 | 38,7 | 38,6 |
| P2-50-5 | 26,3 | 51,4 | 38,8 |
| control | 16,2 | 16,4 | 16,5 |

Thus, the study of halotolerance of the selected strains showed that all of them are able to grow and utilize oil with a high NaCl content. At the same time, the temperature factor affected the degree of oil destruction. The highest percentage of oil recovery was at 35°C.

This work was carried out as part of project No AP05132128 funded by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

УДК 543.9 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-306-307

ЭКСПРЕСНЫЕ МЕТОДЫ БЕСПРИБОРНОЙ ДЕТЕКЦИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ, ОСНОВАННЫЕ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ КОМПЛЕКСОВ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА С ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ

Берлина А.Н., Комова Н.С., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

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

Проведена модификация наночастиц золота олигонуклеотидами и изучено взаимодействие с тяжелыми металлами. Изучены процессы взаимодействия аптамер-металл, охарактеризованы возможности

детекции тяжелых металлов (ртуть, свинец) в присутствии других ионов. Апробированы и сравнены два метода анализа с использованием олигонуклеотидных последовательностей – гомогенный и гетерогенный.

Ключевые слова: олигонуклеотид, золотые наночастицы, тяжелые металлы, токсичные контаминанты

Востребованность простых чувствительных методов детекции ионов тяжелых металлов обусловлена их высокой токсичностью и рисками, возникающими при загрязнении окружающей среды. Комплексы наночастиц-маркеров и рецепторных олигонуклеотидных молекул представляются эффективным средством для такой детекции. Разработаны и апробированы два варианта детекции – гомогенный и гетерогенный. Гомогенный вариант выявления тяжелых металлов основан на агрегации наночастиц золота, модифицированных селективными к соответствующему иону олигонуклеотидами. Такая агрегация визуально выявляется как изменение цвета коллоидного раствора с красного на синий. В гетерогенном варианте детектируемый комплекс наночастиц формируется в определенной зоне тест-полоски после движения вдоль нее тестируемой пробы под действием капиллярных сил. Охарактеризована чувствительность и специфичность предложенных методов по отношению к катионам тяжелых и переходных металлов. Отобраны аптамеры, обеспечивающие максимальную селективность выявления ионов ртути, свинца, сурьмы. Так, для ионов свинца показана возможность детекции в природных водах за 5 мин с пределом обнаружения 1 нг/мл.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №19-44-02020).

UDK 543.9 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-306-307

EXPRESS METHODS OF NON-INSTRUMENT DETECTION OF HEAVY METALS BASED ON GOLD NANOPARTICLE COMPLEXES WITH OLIGONUCLEOTIDES

Berlina A.N., Komova N.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.

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

Gold nanoparticles were modified by oligonucleotides and the interaction with heavy metals was studied. The aptamer-metal interaction processes were studied, and the detection capabilities of heavy metals (mercury, lead) in the presence of other ions were described. Two methods of analysis (homogeneous and heterogeneous) using oligonucleotide sequences were tested and compared.

Key words: oligonucleotide, gold nanoparticles, heavy metals, toxic contaminants

The demand for simple sensitive methods for detection of heavy metal ions is due to their high toxicity and risks associated with environmental pollution. Complexes of nanoparticle markers and receptor oligonucleotide molecules is an effective tool for such detection. Two detection methods (homogeneous and heterogeneous) have been developed and tested. A homogeneous method of heavy metals detection is based on the aggregation of gold nanoparticles modified by oligonucleotides, which selective for the corresponding ion. Such aggregation is visually revealed as a color change of the colloidal solution from red to blue. In the heterogeneous method, the detected nanoparticle complex is formed in a certain zone of the test strip after the test sample moves along it under the action of capillary forces. The sensitivity and specificity of the proposed methods are characterized. Aptamers were selected that provide the maximum selectivity for detecting mercury, lead, and antimony ions. So, for lead ions, the possibility of detection in natural waters for 5 min with a detection limit of 1 ng/ml was shown.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 19-44-02020).

УДК: 550.47:574.24 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-308-309

ГЕОХИМИЧЕСКАЯ ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И ЕЕ ЗНАЧЕНИЕ В РАЗВИТИИ СОВРЕМЕННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ

Градова Н.Б.¹, Ермаков В.В.², Ковальский Ю.В.²

¹ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва
135480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д.20 корп. 1
e-mail: gradova_nb@mail.ru

² Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН Москва 119991 Москва, ул. Косыгина, 19
e-mail: vad-ermak@yandex.ru

Рассмотрены фундаментальные и прикладные вопросы геохимической экологии организмов. Приведены примеры современных инноваций в области биотехнологий с использованием микроорганизмов для получения микроэлементных препаратов, профилактики биогеохимических эндемий и микроэлементозов.

Ключевые слова: биогеохимия, биосфера, биотехнология, геохимическая экология микроэлементозы, ноосфера, почва, растение, техногенез, человек

Геохимическая экология основана выдающимся натуралистом России В.В. Ковальским в 60-х гг. прошлого столетия как следствие системного изучения таксонов биосферы. Она возникла на стыке естественных наук, будучи разделом биогеохимии и общей экологии. В настоящее время ее роль постоянно возрастает в связи с техногенным преобразованием биосферы и проникновением экологии во все сферы жизнедеятельности человека [2].

Геохимическая экология микроорганизмов изучает их роль в биогенной миграции химических элементов в биосфере, процессы концентрирования редких элементов и в настоящее время является основой разработки специальных технологий производства биологически активных добавок, содержащих микроэлементы. Микроорганизмы вследствие ряда своих особенностей представляют удобную экспериментальную модель для изучения многих общебиологических закономерностей взаимодействия организмов с геохимической средой и решения эколого-биогеохимических задач [1].

Установлены закономерности включения микроэлементов в биомассу. Установлено, что 70-80% определяемых в клетке микроэлементов включаются в органические компоненты клетки. Показана возможность получения биомассы, обогащенной Se, при культивировании дрожжей рода *Saccharomyces* (печкарские и пивные дрожжи), *Kluyveromyces marxianus* (на молочной сыворотке), дрожжей рода *Candida* и *Yarrowia* на этаноле, на углеводородах, на гидролизатах целлюлозосодержащего сырья, а также цианобактерий. Разработаны режимы управляемого культивирования микроорганизмов, обеспечивающие получение микробной биомассы с заданным уровнем обогащения Se от 2,0 до 900 мг/кг.

Таким образом, на основании исследований влияния микроэлементов на рост микроорганизмов и закономерностей включения микроэлементов в клетки были разработаны технологии управляемого культивирования микроорганизмов на разных видах сырья. Это позволило получить микробной биомассу с заданным содержанием различных микроэлементов, включённых в органические компоненты клеток, что определяет высокую биологическую ценность продуктов.

Учитывая доступность сырьевых источников, опыт производства и применения микробной биомассы в качестве кормовых добавок, можно полагать, что одним из перспективных направлений коррекции потока микроэлементов в трофической цепи и коррекции микроэлементозов является использование в виде кормовых добавок микробной биомассы с заданным содержанием микроэлементов и биологически активных соединений [3].

Теоретические положения геохимической экологии являются основой прогнозных оценок эволюции химического состава организмов и их биогеохимических функций, изменения локальных и глобальных циклов химических элементов и выяснения механизмов биологического действия макро- и микроэлементов, а также практических приложений в почвоведении, растениеводстве, животноводстве и медицине.

Литература

1. Ермаков В.В., Тютиков С.Ф., Сафонов В.А. Биогеохимическая индикация микроэлементозов. М.: изд-во РАН, 2018. - 386 с.
2. Ковальский В.В. Геохимическая экология. Очерки/ В.В. Ковальский. - М.: Наука, 1974 - 229 с.
3. Gradova N., Ermakov V., Kovalsky Yu. The use of microbiological synthesis products for correction of microelementoses// *Ecologica*. - 2013. - Vol. 20. - No. 72. - P. 575 – 580.

GEOCHEMICAL ECOLOGY OF MICROORGANISMS AND ITS SIGNIFICANCE IN DEVELOPMENT OF NOWADAY BIOTECHNOLOGIES

Gradova N.B.¹, Ermakov V.V.², Kovalsky Yu.V.²

¹ Russian University of Chemical Technology by name D. I. Mendeleeva, Moscow
20, Body 1, Geroev Panfilovtsev str., Moscow, 135480.
e-mail: gradova_nb@mail.ru

² Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry of the RAS Moscow 19, Kosygin str., 119991 Moscow
e-mail: vad-ermakov@yandex.ru

The fundamental and applied problems of geochemical ecology of microorganisms are considered. Examples of modern innovations in the field of biotechnologies with the use of microorganisms for obtaining trace element preparations, prevention of biogeochemical endemias and microelementoses are given.

Key words: animal, biogeochemistry, biotechnology, geochemical ecology, health, man, microelementoses, microorganisms, soil, technogenesis

Geochemical ecology was founded by the outstanding naturalist of Russia V. V. Kovalsky in the 60s of the last century as a result of the systematic study of the biosphere taxons. It originated at the intersection of natural sciences, being a section of biogeochemistry and general ecology. Currently, its role is constantly increasing due to the man-made transformation of the biosphere and the penetration of ecology into all spheres of human life [2].

Geochemical ecology of microorganisms studies their role in the biogenic migration of chemical elements in the biosphere, the processes of concentration of rare elements and nowadays is the basis for the development of special technologies for the production of biologically active additives containing trace elements. Microorganisms, due to a number of their features, provide a convenient experimental model for studying many general biological patterns of interaction between organisms and the geochemical environment and solving ecological and biogeochemical problems [1].

The regularities of the incorporation of trace elements in biomass were discovered. It was found that 70-80% of the trace elements detected in the cell are included in the organic components of the cell. The possibility of obtaining Se-enriched biomass is shown when cultivating yeast of the genus *Saccharomyces* (Baker's and beer yeast), *Kluyveromyces marxianus* (on whey), yeast of the genus *Candida* and *Yarrowia* on ethanol, on hydrocarbons, on hydrolysates of cellulose-containing raw materials, as well as cyanobacteria. Controlled microbial cultivation regimes have been developed to provide microbial biomass with a specified level of Se enrichment from 2.0 to 900 mg/kg.

Thus, based on studies of the effect of trace elements on the growth of microorganisms and the laws of inclusion of trace elements in cells, the technologies for controlled cultivation of microorganisms on different types of raw materials were developed. This allowed to obtain microbial biomass with a given content of various trace elements included in the organic components of cells, which characterizes the high biological value of products.

Taking into account the availability of raw materials, the experience in the production and use of microbial biomass as feed additives, it can be assumed that one of the promising directions for correcting the flow of trace elements in the trophic chain and correcting microelementoses is the use of microbial biomass in the form of feed additives with a given content of trace elements and biologically active compounds [3].

The theoretical provisions of geochemical ecology are the basis for predictive estimates of the evolution of the chemical composition of organisms and their biogeochemical functions, changes in local and global cycles of chemical elements, and elucidation of the mechanisms of biological action of macro- and trace elements, as well as practical applications in soil science, crop production, animal husbandry, and medicine.

References

1. Ermakov V. V., Tyutikov S. F., Safonov V. A. *Biogeochemical indication of trace elements*. Moscow: publishing house of the Russian Academy of Sciences, 2018. - 386 p.
2. Kovalsky V. V. *Geochemical ecology. Essays/ V. V. Kovalsky*. - M.: Nauka, 1974, 229 p.
3. Gradova N., Ermakov V., Kovalsky Yu. *The use of microbiological synthesis products for correction of microelementoses// Ecologica*. - 2013. - Vol. 20. - No. 72. - P. 575 – 580.

УДК 579.69 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-310-311

ШТАММ *GORDONIA* SP. 135 – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ДЕСТРУКТОР ДИБЕНЗОТИОФЕНА

Делеган Я.А., Ветрова А.А.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ИБФМ РАН)

142290, Россия, Московская обл., г. Пушкино, пр. Науки, д. 5

e-mail: mewgia@ya.ru

В геноме штамма *Gordonia* sp. 135 выявлены гены, вовлеченные в деструкцию дибензотиофена (ДБТ). Проведена оценка эффективности деструкции ДБТ при культивировании штамма 135 в минеральной среде (без серы) с глюкозой (гексадеканом) в качестве источника углерода при температуре 28°C методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: *Gordonia*, дибензотиофен, биодegradация

В настоящее время нефть и продукты ее переработки остаются одними из основных загрязнителей окружающей среды. Сера в нефти в основном находится в составе конденсированных тиофенов, в частности, дибензотиофена (ДБТ) и его производных. Разработка способов удаления серосодержащих компонентов нефти из грунтовых и водных экосистем является не менее актуальной задачей, чем аналогичные исследования деструкции углеводородов.

Штамм *Gordonia* sp. 135 выделен из нефтезагрязненного грунта в Москве. Полный геном штамма включает хромосому размером 5 039 827 п.н. и кольцевую плазмиду размером 164 963 п.н. (Delegan et al., 2020).

Исследование физиолого-биохимических свойств штамма показало, что штамм 135 является активным деструктором ДБТ. Интересно отметить, что в процесс деструкции ДБТ штаммом вовлечены гены, отличные от оперона dsz, который чаще всего встречается у ДБТ-деградирующих штаммов.

Способность штамма утилизировать ДБТ изучали при культивировании штамма в минеральной среде, содержащей 200 мМ ДБТ в качестве единственного источника серы, а также в присутствии глюкозы (гексадекана) в качестве источника углерода при температуре 28°C. Штамм активно рос на данной среде, причем середина экспоненциальной фазы приходилась на 50 часов как при росте на глюкозе, так и гексадекане. Эффективность деградации ДБТ оценивали посредством определения его остаточного содержания методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Через 5 суток культивирования степень деградации ДБТ штаммом *Gordonia* sp. 135 в колбах с глюкозой составила 36,05%, а в колбах с гексадеканом – 28,97%.

Полученные результаты позволяют рассматривать штамм *Gordonia* sp. 135 как биотехнологически перспективный. Штамм будет в дальнейшем использован при разработке способа микробного обессеривания нефти.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 19-74-00097).

Литература

Delegan Y., Valentovich L., Vetrova A., Frantsuzova E., Kocharovskaya Y. Complete genome sequence of *Gordonia* sp. 135, a promising dibenzothiophene- and hydrocarbon-degrading strain // *Microbiol Resour Announc.* 2020. Vol. 9. №2. 9:e01450-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.01450-19>.

THE STRAIN *GORDONIA* SP. 135 – PROMISING DIBENZOTHIOPHENE DEGRADER

Y. Delegan, A. Vetrova

Federal Research Center «Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Science» (PSCBR RAS); G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences (IBPM RAS)
142290 Prospekt Nauki 5, Pushchino, Moscow region, Russia
e-mail: mewgia@ya.ru

The genes supposedly involved in dibenzothiophene (DBT) degradation were identified in the genome of *Gordonia* sp. 135. The efficiency of DBT degradation was evaluated by high-performance liquid chromatography after strain cultivation in mineral medium (without sulfur) with glucose (hexadecane) as a carbon source at 28°C.

Key words: *Gordonia*, dibenzothiophene, biodegradation

Currently, crude oil and its refined products remain one of the main environmental pollutants. The majority of the sulfur in crude oil occurs bounded in condensed thiophenes, in particular, dibenzothiophene (DBT) and its derivatives. The development of methods for removal of sulfur compounds of oil from environments is no less important than similar studies of hydrocarbon degradation.

Gordonia sp. 135 was isolated from oil-contaminated soil in Moscow. The genome of strain 135 was completely sequenced; it consists of a 5,039,827-bp circular chromosome and a 164,963-bp circular plasmid (Delegan et al., 2020).

The study of the physiological and biochemical properties of the strain revealed that the strain 135 is an active DBT degrader. It is interesting to note that the genes probably involved in DBT degradation in the genome of strain 135 are not similar to genes of well-known dsz operon in other bacteria.

The ability of the strain to utilize DBT was studied during the strain growth in a mineral medium containing 200 mM DBT as the sole sulfur source, and with glucose or hexadecane as carbon source at 28°C. The mid-exponential phase had 50 hours during the growth on either glucose or hexadecane. The efficiency of DBT degradation was evaluated by determining its residual content using high-performance liquid chromatography. After 5 days cultivation, the degree of DBT degradation by *Gordonia* sp. 135 was 36.05% in flasks with glucose and 28.97% in flasks with hexadecane.

The results obtained allow us to consider *Gordonia* sp. 135 as a promising strain for environmental biotechnology. The strain will be further used in the development of a method for crude oil biodesulfurization.

This work was financially supported by the Russian Science Foundation (grant number 19-74-00097).

References

Delegan Y., Valentovich L., Vetrova A., Frantsuzova E., Kocharovskaya Y. Complete genome sequence of *Gordonia* sp. 135, a promising dibenzothiophene- and hydrocarbon-degrading strain // *Microbiol Resour Announc.* 2020. Vol. 9. №2. 9:e01450-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.01450-19>.

УДК 579.66 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-311-313

НОВЫЕ ШТАММЫ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ

Франк Ю. А.^{1,2,3}, Тыщенко Н. В.^{1,2}, Ивасенко Д. А.^{1,2}, Косов А. В.², Рыбкин Д. С.², Лукьянова Е. А.², Герасимчук А. Л.¹

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия
634050, Томск, пр. Ленина, д.36

² ООО «Дарвин», Томск, Россия
634040, Томск, ул. Высоцкого, д.28, стр. 3

³ АО «Томский научно-исследовательский и проектный институт нефти и газа» (ТомскНИПИнефть), Томск, Россия
634027, Томск, пр. Мира, д.72
e-mail: yulia.a.frank@gmail.com

Выделены и идентифицированы новые штаммы углеводородокисляющих микроорганизмов из нефтезагрязненных почв и донных осадков. Выделенные микроорганизмы окисляют компоненты сырой нефти в

присутствии кислорода и могут использоваться в составе биопрепаратов-деструкторов.

Ключевые слова: штаммы микроорганизмов; углеводороды нефти; аэробное окисление; биопрепараты для деструкции нефти.

Нефть и нефтепродукты относятся к биологически трудноокисляемым веществам и для их деструкции в ходе биоремедиации почв и водных объектов применяют биопрепараты на основе микроорганизмов. Способность окислять углеводороды нефти присуща микроорганизмам разных систематических групп, однако большинство активных деструкторов углеводородов представлены бактериями. Благодаря способности к усвоению широкого спектра углеводородов и высокой скорости роста они представляют наибольший интерес для практического применения.

Целью работы является выделение и идентификация активных штаммов бактерий-деструкторов углеводородов нефти, перспективных для включения в состав коммерческих биопрепаратов. Чистые культуры были получены в селективных условиях на минеральной питательной среде с добавлением сырой нефти в качестве органического субстрата. Выделенные микроорганизмы идентифицированы путем анализа последовательностей гена 16S рПНК.

По результатам идентификации на основе поиска ближайших родственников в базе данных GenBank NCBI были исключены штаммы, близкородственные условно патогенным бактериям. Изоляты, окисляющие компоненты сырой нефти и перспективные для включения в состав биопрепаратов, принадлежали к родам *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и *Oleomonas* (Proteobacteria) и *Bacillus* (Firmicutes). Наиболее активные штаммы, *Acinetobacter junii* E-1, *Acinetobacter calcoaceticus* E-3 и *Oleomonas* sp. E-2, были депонированы в коллекцию бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Данное научное исследование выполнено при поддержке Программы повышения конкурентоспособности ТГУ проект № 8.2.13.2020 и по заданию Министерства науки и высшего образования (проект № 0721-2020-0019)

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-311-313

NOVEL STRAINS OF MICROORGANISMS DEGRADING PETROLEUM HYDROCARBONS

Frank Y.A.^{1,2,3}, **Tyschenko N.V.**^{1,2}, **Ivasenko D.A.**^{1,2}, **Kosov A.V.**², **Rybkin D.S.**², **Lukjanova E.A.**², **Gerasimchuk A.L.**¹

¹ National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia
634050, Tomsk, Lenina Ave., 36

² Darwin LLC, Tomsk, Russia
634040, Tomsk, Vysotskogo Str., 28/3

³ Tomsk Oil and Gas Research and Design Institute (TomskNIPIneft), Tomsk, Russia
634027, Tomsk, Mira Ave., 72
e-mail: yulia.a.frank@gmail.com

Novel strains of hydrocarbons degrading microorganisms were isolated from oil contaminated soil and bottom sediments and identified. Isolates oxidize components of crude oil in presence of oxygen and can be used as a part of commercial biological products for oil destruction.

Key words: strains of microorganisms; petroleum hydrocarbons; aerobic oxidation; biological products for oil destruction.

Crude oil and oil products are slowly oxidized by microorganisms in natural environments, and for their destruction in the course of bioremediation of soils and water bodies microbial biological products can be applied. The ability to oxidize oil hydrocarbons is inherent in microorganisms of various systematic groups; however, most active hydrocarbon destructors are found among bacteria. Due to the ability to oxidize a wide range of hydrocarbons and a high growth rate, they are of most interest for practical use.

The aim of the current work is the isolation and identification of active strains of bacteria-degraders of oil hydrocarbons, promising for inclusion in the composition of commercial biological products. Pure cultures were obtained under selective conditions in a mineral nutrient medium with the addition of crude oil as an organic substrate. Isolated microorganisms were identified by analysis of the 16S rRNA gene sequences.

Based on identification results obtained by the search for the closest relatives in the GenBank NCBI database, the strains related to conditionally pathogenic bacteria were excluded from research. Isolates oxidizing the

components of crude oil and promising for inclusion in biological products belonged to genera *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Oleomonas* (Proteobacteria) and *Bacillus* (Firmicutes). The most active strains, *Acinetobacter junii* E-1, *Acinetobacter calcoaceticus* E-3 and *Oleomonas* sp. E-2, were deposited in the collection of bacteria, bacteriophages and fungi of the Federal State Budget Scientific Center of the Scientific and Research Center "Vector".

This research was supported by "The Tomsk State University competitiveness improvement programme" grant (No 8.2.13.2020) and by the Ministry of Science and Higher Education (project № 0721-2020-0019).

УДК 543.9 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-313-314

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ ХЕЛАТОВ С БЕЛКОМ В ТЕСТ-ПОЛОСКАХ ДЛЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ИОНОВ РТУТИ

Комова Н.С., Берлина А.Н., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

*Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский проспект, д.33
e-mail: nad4883@yandex.ru*

Охарактеризовано применение конъюгатов серосодержащих хелат – белок в неконкурентном проточном мембранном анализе катионов тяжелых металлов. Показано, что меркаптоянтарная кислота и глутатион в сочетании с конъюгатами олигонуклеотид – золотая наночастица обеспечивают выявление в воде до 100 и 5 нг/мл ионов ртути, соответственно.

Ключевые слова: конъюгат, глутатион, меркаптоянтарная кислота, золотые наночастицы, ионы ртути

Быстрое и точное определение степени загрязнения тяжелыми металлами является важной задачей мониторинга объектов окружающей среды (воды, почвы и других). Эффективным подходом, обеспечивающим методически простое внелабораторное тестирование, является сочетание мультимембранных комплексов (тест-полосок) и олигонуклеотидных рецепторов, меченных окрашенными

наночастицами. Однако для эффективной генерации окрашенной зоны на тест-полоске, свидетельствующей о наличии или отсутствии целевого аналита в пробе, важен выбор иммобилизуемого компонента, улавливающего комплекс

наночастица – олигонуклеотид – катион металла. Показана эффективность в качестве такого связывающего агента бычьего сывороточного альбумина, конъюгированного с глутатионом, либо меркаптоянтарной кислотой. При использовании глутатиона предел обнаружения ионов ртути в воде составил 100 нг/мл, а переход к меркаптоянтарной кислоте обеспечил его снижение до 5 нг/мл. Продолжительность тестирования – 5 мин.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН (подпрограмма 14.3 «Фундаментальные основы и новые эффективные методы химического анализа и исследования структуры веществ и материалов»).

UDK 543.9 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-313-314

APPLICATION OF SULFUR-CONTAINING CHELATES COMPLEXES WITH PROTEINS FOR HIGH-SENSITIVE DETECTION OF HEAVY METALS

Komova N.S., Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.

*A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119071, Moscow, Leninsky prospect, 33
e-mail: nad4883@yandex.ru*

The usage of sulfur-containing chelate - protein conjugates in a non-competitive flow membrane analysis of heavy metal ions has been characterized. It was shown that these reagents in combination with oligonucleotide - gold nanoparticle conjugates provide the detection of 5 ng/ml and 100 ng/ml of mercury ions in water in the case of

glutathione and mercaptosuccinic acid, respectively.

Key words: conjugate, glutathione, mercaptosuccinic acid, gold nanoparticles, mercury ions

Rapid and precise determination of the pollution degree by heavy metals is a key task of monitoring environmental objects (water, soil and others). An effective approach that provides a methodically simple off-laboratory testing is the combination of multi-membrane composites (test strips) and oligonucleotide receptors labeled by colored nanoparticles. However, it is important to select an immobilized component that detect the nanoparticle - oligonucleotide - metal ion complex for the efficient generation of the colored zone on the test strip. It indicates the presence or absence of the target analyte in the sample. The efficacy of bovine serum albumin conjugated with glutathione or mercaptosuccinic acid has been shown. When using glutathione, the detection limit of mercury ions in water was 100 ng/ml, and the transition to mercaptosuccinic acid ensured its decrease to 5 ng/ml. Duration of analysis is 5 minutes.

This work was supported by Program of the Presidium of the Russian Acad. Sci. "Fundamental Foundations and New Effective Methods of Chemical Analysis and Investigation of the Structure of Substances and Materials".

УДК 579.66/663 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-314-316

СОЗДАНИЕ БИОКОМПЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ЛИКВИДАЦИИ АВАРИЙНЫХ РАЗЛИВОВ НЕФТИ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ НА ПОВЕРХНОСТИ МИКРОКАПСУЛ

**Николаев Ю.А.¹, Борзенков И.А.¹, Лойко Н.Г.¹, Иванова А.Е.¹, Канапацкий Т.А.¹, Демкина Е.В.¹,
Карабашев С.Г.², Близнац И.В., Эль-Регистан Г.И.¹**

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, РФ, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2

² ООО "Компания БНТ", 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр.75-А.

e-mail: NikolaevYA@mail.ru

Разработан биоконпозитный материал, состоящий из микрокапсул из сополимера полиуретана/поли мочевины с иммобилизованными на них углеводородокисляющими бактериями. Применение нового материала повышает эффективность разрушения углеводов.

Ключевые слова: углеводородокисляющие бактерии, биопрепараты, микрокапсулы, увеличение срока хранения, ликвидация разливов нефти.

Нефть и нефтепродукты являются самым массовым загрязнителем окружающей среды (Koshlaf, Ball, 2017), а наиболее экологичной (безопасной) и эффективной технологией разложения нефтепродуктов является применение биопрепаратов на основе углеводородокисляющих бактерий (УОБ). Однако, бактерии – биодеструкторы, быстро теряют жизнеспособность (Кузнецов с соавт., 2010). Соответственно, актуальной остаётся задача повышения их жизнеспособности, что в прикладном аспекте выражается как продление сроков хранения и повышения эффективности производства и применения биопрепаратов на основе УОБ. Способом стабилизации биопрепарата была выбрана иммобилизация на поверхности микрокапсул из сополимера мочевины и уретана, поскольку в прикрепленном состоянии бактерии обладают повышенной стрессоустойчивостью (Zur et al., 2016). Иммобилизация бактерий на поверхности носителей широко используется в экобиотехнологиях очистки стоков и ремедиации почв (Кузнецов с соавт., 2010).

Объектом исследования были УОБ *Acinetobacter seifertii*, *Rhodococcus erythropolis* и *Pseudomonas extremaustralis*. Для иммобилизации УОБ были использованы микрокапсулы (МК) из сополимера поли мочевины/полиуретан сферической формы диаметром 50-100 мкм с высокой удельной поверхностью (540 см²/г сухих МК). Всего получено четыре разновидности МК, различающихся материалом, гидрофильностью поверхности, формой и морфологией поверхности. Для прикрепления УОБ к МК впервые использовали культивирование УОБ в присутствии МК. Эффективность прикрепления бактерий к МК исследовали методом сканирующей электронной микроскопии. Деструкцию углеводов культурами УОБ после длительного хранения последних определяли как прямым определением количества n-алканов хроматографически, так и по накоплению CO₂.

Результаты. Всего было синтезировано 4 типа МК, различающихся материалом, гидрофильностью, формой и топологией поверхности. Только один тип оказался пригодным для иммобилизации УОБ – с поверхностью, модифицированный хитозаном, имеющий вид сморщенных сфер. На поверхности таких

МК образовывались обильные биопленки всех испытанных УОБ, по массе близкие к массе МК. УОБ, иммобилизованные на поверхности МК, после нескольких месяцев хранения в неблагоприятных условиях (жидкие препараты, комнатная температура), разрушали углеводороды существенно эффективнее, чем нестабилизированные препараты УОБ.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-05009) и, частично, - при финансировании Минобрнауки РФ.

Литература

1. Koshlaf E., Ball A.S. *Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments AIMS Microbiology*, 2017, 3(1): 25-49.
2. Sihag S, Pathak H, Jaroli D (2014) *Factors affecting the rate of biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. Int J Pure App Biosci* 2: 185-202.
3. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б., Лушников С.В., Энгельхарт М., Вайссер Т, Чеботаева М.В. «Прикладная эковиотехнология», Москва, Бином, 2010, 1 том, стр. 472-620.
4. Zur J., Wojcieszynska D., Guzik U. *Metabolic Responses of Bacterial Cells to Immobilization // Molecules* 2016, 21, 958; doi:10.3390/molecules21070958

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-314-316

CREATION OF BIOCOMPOSITE MATERIALS FOR OIL SPILL RESPONSE BASED ON THE IMMOBILIZATION OF HYDROCARBON-OXIDIZING BACTERIA ON THE SURFACE OF MICROCAPSULES

Nikolaev Yu.A.¹, Borzenkov I.A.¹, Loyko N.G.¹, Ivanova A.E.¹, Kanapatsky T.A.¹, Demkina E.V.¹, Karabashev S.G.², Bliznetc I.V.², El-Registan G.I.¹

¹ FITS Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Russian Federation, 119071, Moscow, Leninsky Prospect, 33, Building 2

² LLC "BNT Company", 119234, Moscow, Leninsky mountains, d. 1, p. 75-A.
e-mail: NikolaevYA@mail.ru

A biocomposite material was developed consisting of microcapsules of a polyurethane/polyurea copolymer with hydrocarbon-oxidizing bacteria immobilized on them. The use of new material increases the efficiency of the destruction of hydrocarbons.

Key words: углеводородокисляющие бактерии, биопрепараты, микрокапсулы, увеличение срока хранения, ликвидация разливов нефти.

Oil and oil products are the most widespread environmental pollutant (Koshlaf, Ball, 2017), and the most environmentally friendly (safe) and effective technology for the decomposition of oil products is the use of biologics based on hydrocarbon-oxidizing bacteria (HOB). However, bacteria, biodestructors, quickly lose their viability (Kuznetsov et al., 2010). Accordingly, the task of increasing their viability remains relevant, which in the applied aspect is expressed as extending the shelf life and increasing the effectivity and profit of biological products based on HOB. Immobilization on the surface of microcapsules from a urea-urethane copolymer was chosen as a method of stabilizing the biological product, since bacteria have increased stress resistance in the attached state (Zur et al., 2016). HOB immobilization on the surface of carriers is widely used in ecobiotechnologies of water treatment and soil remediation (Kuznetsov et al., 2010).

The object of the study was the HOB *Acinetobacter seifertii*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas extremaustralis*. Microcapsules (MC) of a spherical polyurea/polyurethane copolymer with a diameter of 50-100 µm with a high specific surface (540 cm² /g dry MC) were used to immobilize HOB. In total, four MC varieties were obtained, which differ in surface hydrophilicity, surface shape and morphology, and material. For the attachment of HOB to MC, their joint cultivation was first used. The efficiency of bacterial attachment to MC was studied by scanning electron microscopy. Hydrocarbon destruction by HOB cultures after long-term storage of the latter was determined both by direct determination of the number of n-alkanes chromatographically and by the accumulation of CO₂.

Results. A total of 4 types of MC were synthesized, differing in material, hydrophilicity, and shape. Only one type was found to be suitable for immobilization of HOB - with a surface modified with chitosan. Abundant biofilms of all tested HOB were formed on the surface of such MCs, their mass being close to the mass of MC. HOB immobilized

on the surface of MK destroyed hydrocarbons significantly more effectively than for unstabilized preparations.

References

1. Koshlaf E., Ball A.S. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments *AIMS Microbiology*, 2017, 3(1): 25-49.
2. Sihag S, Pathak H, Jaroli D (2014) Factors affecting the rate of biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *Int J Pure App Biosci* 2: 185-202.
3. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б., Лушников С.В., Энгельхарт М., Вайссер Т, Чеботаева М.В. «Прикладная экобиотехнология», Москва, Бином, 2010, Т. 1., С. 472-620.
4. Zur J., Wojcieszynska D., Guzik U. Metabolic Responses of Bacterial Cells to Immobilization // *Molecules* 2016, 21, 958; doi:10.3390/molecules21070958

УДК 579.695 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-316-318

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПСИХРОФИЛЬНОГО ШТАММА *FUSARIUM OXYSPORUM* ДЛЯ ОЧИСТКИ ЦИАНИДСОДЕРЖАЩИХ ПРОМЫШЛЕННЫХ ОБОРОТНЫХ ВОД

Павлов И.Н.^{1,2}, Литовка Ю.А.^{1,2}, Петренко С.М.¹, Эназаров Р.Х.¹

¹ Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, ФИЦ «Красноярский научный центр» СО РАН, Красноярск, Россия 660036, Красноярск, Академгородок, 50/28

² Сибирский государственный университет науки и технологий им. М.Ф. Решетнева, Красноярск, Россия 660037, Красноярск, пр. им. газеты Красноярский рабочий, 31
e-mail: forester24@mail.ru

Исследован микробиом промышленных цианид-содержащих оборотных вод с помощью глубокого секвенирования участка гена 16S рРНК; выделены аборигенные штаммы из воды, многолетней погружной древесины и *Equisetum fluviatile*. Осуществлен скрининг биодеструкторов цианидов; подобраны условия культивирования штамма *Fusarium oxysporum* в шейкер-инкубаторе и биореакторе.

Ключевые слова: микробиом, цианид-содержащие воды, биодеструкция, *Fusarium oxysporum*, глубинное и твердофазное культивирование, биореактор.

Таксономическое разнообразие микробиома промышленных цианид-содержащих оборотных вод исследовали методом секвенирования суммарного ампликона региона V3-V4 гена 16S рРНК на секвенаторе MiSeq (Illumina) (ЦКП «Геномика», Новосибирск). Таксономическую принадлежность последовательностей OTU [1] определяли с помощью SINTAX [2]. В воде с максимальным уровнем техногенного загрязнения обнаружены преимущественно бактерии из классов Alpha-, Beta- и Gammaproteobacteria; редко – Actinobacteria. Доминируют представители семейств Pseudomonadaceae, Comamonadaceae; часто встречаются Erythrobacteriaceae, Sphingomonadaceae, Alcaligenaceae. Чистые культуры, выделенные из воды, хвоща приречного (*Equisetum fluviatile*) и многолетней (5-7 лет) погружной древесины идентифицированы методом секвенирования участка гена 16S и генетического маркера ITS соответственно для бактерий и грибов. В водном микробиоме преобладает вид *Pseudomonas alcaliphila*, реже встречаются *P. pseudoalcaligenes*, *P. helmanticensis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Serratia liquefaciens*. В древесине обнаружены *Pseudomonas tolaasii*, *P. gessardii*, *Brevundimonas diminuta*, *Citrobacter freundii* и аскомицеты *Fusarium oxysporum*, *F. solani*. Из тканей *E. fluviatile* выделены *Pseudomonas protegens*, *P. helmanticensis*, *Providencia alcalifaciens*, *Bacillus subtilis*, *B. aryabhatai*, *A. calcoaceticus*, *Staphylococcus warneri*.

Скрининг биодеструкторов проводили среди микромицетов, выделенных из древесины, на агаризованной оборотной воде с высоким уровнем техногенного загрязнения цианидами. Отобран штамм OXD9 *F. oxysporum* с максимальными ростовыми параметрами (скорость роста 2,7-3,9 мм/сут; ростовой коэффициент 44-62). При добавлении ацетата натрия и/или хлорида аммония скорость роста увеличивалась в среднем в 1,3 раза (P<0,05). Штамм колонизировал поликомпонентные растительные субстраты (структурная основа для иммобилизации мицелия и дополнительный источник питания) при их увлажнении цианид-содержащей оборотной водой (25±1°C; 5-7 сут; скорость роста 3,8-4,3 мм/сут). Экспериментально показана высокая эффективность мицелиально-растительных препаратов in vitro в течение пяти суток при 15-25°C (снижение концентрации цианид-ионов до 79 %, P<0,05). Осуществлен подбор питательной среды для глубинного культивирования штамма OXD9 в шейкер-инкубаторе BLBIO-OS-2012 (5 сут, 24°C, 200 об·мин⁻¹). Масштабирование осуществляли в периодической глубинной культуре на среде Сабуро (про-

дуктивность биомассы в шейкере 10,8 г·л⁻¹) в ферментере BIORUS (рабочий объем 15,8 л; объем инокулята 5 %; автоматический контроль температуры, pH и O₂; pH 5,8; стартовая температура 28°C (далее 26°C); частота перемешивания 300 об·мин⁻¹; уровень растворенного O₂ 25-35 %). Длительность ферментации составила 76 ч: концентрация биомассы 16,7 г/л; удельная скорость роста 0,065 ч⁻¹; время удвоения биомассы 10,6 ч; экономический коэффициент 0,4. Глубинный инокулят предназначен для получения биологически активных матов на основе растительных субстратов и гриба *F. oxysporum*. Штамм OXD9 характеризуется высокой цианид-деградирующей способностью и ростовыми параметрами при 15-25±1°C; совместим с доминирующими видами аборигенных бактерий.

Литература

1. Edgar R.C. UNOISE2: Improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon reads. 2016. *bioRxiv* doi:10.1101/081257
2. Edgar R. C. SINTAX, a Simple Non-Bayesian Taxonomy Classifier for 16S and ITS Sequences. 2016. *bioRxiv* doi:10.1101/074161.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-316-318

PSYCHROPHILIC STRAIN *FUSARIUM OXYSPORUM* – PROSPECTS FOR THE USE FOR BIODEGRADATION OF CYANIDES IN INDUSTRIAL CIRCULATING WATERS

Pavlov I.N.^{1,2}, Litovka Yu.A.^{1,2}, Petrenko S.M.¹, Enazarov R.Kh.¹

¹ Sukachev Institute of Forest SB RAS Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center SB RAS», Krasnoyarsk, Russia

660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/28

² Reshetnev Siberian State University of Science and Technology, Krasnoyarsk, Russia

660037, Krasnoyarsk, Krasnoyarskiy rabochiy av., 31

e-mail: forester24@mail.ru

The microbiome of industrial cyanide-containing circulating waters studied using deep sequencing of the 16S rRNA gene region. Microorganisms are isolated from water, perennial submerged wood and *Equisetum fluviatile*. Cyanide bio destructors were screened; cultivation conditions of the *Fusarium oxysporum* strain in a shaker incubator and bioreactor were selected.

Key words: microbiome, cyanide-containing water, biodegradation, *Fusarium oxysporum*, deep and solid phase cultivation, bioreactor.

The taxonomic diversity of the microbiome of industrial cyanide-containing reverse water studied by sequencing the total amplicon of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene on a MiSeq sequencer (Illumina) (SB RAS Genomics Core Facility (ICBFM, Novosibirsk). The taxonomic affiliation of the OTU sequences [1] was determined using SINTAX [2]. In water with the maximum level of technogenic pollution, mainly bacteria from the classes Alpha-, Beta- and Gammaproteobacteria were found; rarely Actinobacteria. Representatives of the families Pseudomonadaceae, Comamonadaceae dominate; often found Erythrobacteriaceae, Sphingomonadaceae, Alcaligenaceae. Pure cultures isolated from water, *Equisetum fluviatile*, and perennial (5–7 years) submersible wood were identified by sequencing of the 16S gene and the ITS genetic marker, respectively, for bacteria and fungi.

Pseudomonas alcaliphila dominates in the aquatic microbiome; *P. pseudoalcaligenes*, *Phelmanticensis*, *Acinetobacter calcoaceticus* and *Serratia liquefaciens* are less common. The bacteria *Pseudomonas tolaasii*, *P. gessardii*, *Brevundimonas diminuta*, *Citrobacter freundii* and ascomycetic fungi *Fusarium oxysporum* and *F.solani* found in immersed wood. The bacteria *Pseudomonas protegens*, *P. helmanticensis*, *Providencia alcalifaciens*, *Bacillus subtilis*, *B. aryabhatai*, *A. calcoaceticus* and *Staphylococcus warneri* were isolated from plant tissues of *E. fluviatile*.

Biodestructors screened among micromycetes isolated from submersible wood on agarized circulating water with a high level of anthropogenic cyanide contamination. A strain of OXD9 *F. oxysporum* with maximum growth parameters selected (growth rate 2.7-3.9 mm / day; growth coefficient 44-62). With the addition of sodium acetate and / or ammonium chloride, the growth rate increased on average by 1.3 times (P <0.05). The strain colonized multicomponent plant substrates (the structural basis for immobilization of mycelium and an additional food source) when they were moistened with cyanide-containing reverse water (25 ± 1 °C; 5-7 days; growth rate 3.8-4.3 mm / day). The high efficiency of in vitro mycelial-herbal preparations for five days at 15-25 °C (a decrease in the

concentration of cyanide ions to 79%, $P < 0.05$) was experimentally shown.

Nutrient medium for the deep cultivation of strain OXD9 selected in a shaker incubator BLBIO – OS – 2012 (5 days, 24 °C, 200 rpm⁻¹) in 250 ml Erlenmeyer flasks. Scaling was carried out in a periodic deep culture on Saburo medium (biomass productivity in a shaker 10.8 g · l⁻¹) in a BIORUS fermenter (working volume 15.8 l; inoculum volume 5%; automatic control of temperature, pH and O₂; pH 5, 8; starting temperature 28 °C (further 26 °C); stirring frequency 300 rpm⁻¹; dissolved O₂ level 25-35%). The duration of the fermentation was 76 hours: biomass concentration of 16.7 g / l; specific growth rate of 0.065 h⁻¹; biomass doubling time 10.6 hours; economic coefficient 0.4.

The deep inoculum designed to produce biologically active mats based on plant substrates and the fungus *F. oxysporum*. Strain OXD9 characterized by high cyanide-degrading ability and growth parameters at 15-25±1°C; compatible with the dominant species of native bacteria.

References

1. Edgar R.C. UNOISE2: Improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon reads. 2016 bioRxiv doi: 10.1101/081257
2. Edgar R. C. SINTAX, a Simple Non-Bayesian Taxonomy Classifier for 16S and ITS Sequences. 2016 bioRxiv doi: 10.1101/074161.

УДК 579.695 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-318-320

УПРАВЛЕНИЕ ПРОЦЕССОМ АНАММОКС НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА МЕТАГЕНОМА АКТИВНОГО ИЛА АНАММОКС

Пименов Н.В., Марданов А.В., Равин Н.В., Каллистова А.Ю., Грачев В.А., Берестовская Ю.Ю., Николаев Ю.А.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, РФ
Россия, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2
e-mail: NPimenov@mail.ru

На основе анализа метагенома сообщества микроорганизмов активного ила, реализующего процесс бескислородного окисления аммония (Анаммокс) сделано заключение, что фолат и формиат должны повышать стабильность и эффективность функционирования процесса Анаммокс, что было подтверждено в ходе выполненной работы.

Ключевые слова: Анаммокс-процесс; удаление азота; микробное сообщество; управление; межвидовой обмен метаболитами.

Анаммокс-процесс, окисление аммония нитритом в бескислородных условиях (**anaerobic ammonia oxidation**), является важным биохимическим энергодающим процессом, реализуемым бактериями-планктомицетами порядка *Candidatus Brocadiales* (van Niftrik and Jetten, 2012). Этот процесс обеспечивает до 80% круговорота азота в морских экосистемах (Devol, 2015), а также является основой важнейшей биотехнологии удаления азота из сточных вод (Каллистова с соавт., 2016). При этом процесс анаммокс в природных и техногенных экосистемах может быть реализован только сообществом бактерий, обеспечивающих окисление аммония до нитрита, и поэтому называемых анаммокс-сообществами. Очевидно, что исследование закономерностей функционирования анаммокс-сообществ актуально и носит как фундаментальный, так и прикладной характер.

Анаммокс-процесс в настоящее время детально исследован (биохимия, генетика, микробиология, технологические аспекты, геохимия), однако, слабоизученными остаются механизмы взаимоотношений микроорганизмов внутри анаммокс-сообществ, которые могут быть использованы для регулирования технологических процессов удаления азота.

Метагеномный анализ анаммокс-сообщества из функционирующего биореактора, выявил, что анаммокс-бактерии не могут сами синтезировать фолиевую кислоту (интермедиат синтеза нуклеиновых кислот) и формиат (важный вторичный метаболит, необходимый для автотрофного роста). Мы предположили, что добавление данных метаболитов должно положительным образом сказаться на показателях роста и устойчивости анаммокс-сообщества, что и составило цель настоящей работы.

Для культивирования и сравнительного исследования влияния различных факторов на свойства анаммокс-сообщества был сконструирован блок биореакторов, состоящий из трех параллельных линий, каждая из которых представляла реактор циклического действия (SBR-типа, sequencing-batch reactor) с рабочим объемом 4.5 л, цилиндрической формы из полиметилметакрилата; способ удержания биомассы

(активного ила) – фиксация на нетканом материале из полиэтиленовых нитей типа Поливом (ООО «Этек», Калуга). Работа реактора (управление потоками жидкости, подача воздуха, контроль температуры) была полностью автоматизирована. Реактор инокулирован активным илом, изначально происходящим из полупромышленного реактора Анаммокс для очистки фильтрата от обезвоживания сброженного осадка сточных вод на Люберецких очистных сооружениях АО «Мосводоканал», и впоследствии адаптированного (культивированного) в лабораторном реакторе.

Метагеномный анализ, проведенный в процессе функционирования биореактора, позволил выявить доминирующие микроорганизмы анаммокс-сообщества, а также изменение их количеств в ходе адаптации и роста в реакторе.

После достижения устойчивого удаления более 80% азота при умеренной нагрузке по азоту микробное сообщество активного ила было подвергнуто стрессовой нагрузке – резкому двукратному увеличению концентрации аммония, что является стрессором для анаммокс-бактерий (Aktan et al., 2012; Xie et al., 2017). В результате производительность контрольного реактора по удалению азота снизилась на 25% и восстановилась до исходного уровня только через 20 сут. В присутствии фолата скорость удаления азота осталась на исходном уровне с тенденцией к увеличению, а в присутствии формиата скорость удаления азота упала так же, как и в контроле, но через 20 сут выросла до уровня 120% от исходного.

Было также показано, что присутствие этих метаболитов существенно ускоряет адгезию активного ила анаммокс на полиэтилене – если для полной адгезии ила в контроле требовалось 4 недели, то в присутствии фолата или формиата – 2 недели.

Полученные результаты позволяют заключить, что фолат и формиат могут быть использованы для повышения стабильности и эффективности функционирования Анаммокс-биореакторов очистки сточных вод.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-08008) и госзадания ФИЦ Битехнологии РАН.

Литература

5. van Niftrik L., Jetten M.S.M. *Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: unique microorganisms with exceptional properties.* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012. V. 76. P. 585–596.
6. Devol A.H. *Denitrification, Anammox and N₂ Production in Marine Sediments.* // *Annu. Rev. Mar. Sci.* 2015. 7:403–423.
7. Каллистова А.Ю., Дорофеев А.Г., Николаев Ю.А., Козлов М.Н., Кевбрина М.В., Пименов Н.В. *Роль анаммокс-бактерий в очистке сточных вод от соединений азота* // *Микробиология.* 2016. Т. 85. №2. С. 126–144.
8. Aktan C.K., Yapsakli K., Mertoglu B. *Inhibitory effects of free ammonia on Anammox bacteria.* // *Biodegradation* 2012. 23(5):751-762.
9. Xie H., Ji D., Zang L. *Effects of Inhibition Conditions on Anammox process* // *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 2017, 100, 012149.

УДК 579.695 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-318-320

ANAMMOX PROCESS CONTROL BASED ON ANALYSIS OF ANAMMOX ACTIVATED SLUDGE METAGENOME

Pimenov N.V., Mardanov A.V., Ravin N.V., Callistova A.Yu., Grachev V.A., Berestovskaya Yu.Yu., Nikolaev Yu.A.

S.N. Vinogradsky Institute of Microbiology, FRC Biotechnology RAS, Russia
119071, Moscow, Leninsky Prospekt, building 33, k. 2
e-mail: NPimenov@mail.ru

Based on the analysis of the metagenome of the community of activated sludge microorganisms that implements the process of anoxic oxidation of ammonia (Anammox), it was concluded that folate and formate should increase the stability and efficiency of the Anammox process, which was confirmed in the course of this work.

Key words: Anammox process, nitrogen removal, microbial community, management, interspecific metabolite metabolism.

The anammox process, the oxidation of ammonium by nitrite under anoxic conditions (**anaerobic ammonia oxidation**), is an important biochemical energy-supplying process realized by planktonic bacteria of the order *Candidatus Brocadiales* (van Niftrik and Jetten, 2012). This process provides up to 80% of the nitrogen cycle in marine ecosystems (Devol, 2015), and is also the basis of the most important biotechnology for nitrogen removal

from wastewater (Kallistova et al., 2016). In this case, the anammox process in natural and technogenic ecosystems can be realized only by a community of bacteria that provide oxidation of ammonium to nitrite, and therefore are called anammox communities. Obviously, the study of the functioning of anammox communities is relevant and is of both fundamental and applied importance.

The anammox process is currently studied in detail (biochemistry, genetics, microbiology, technological aspects, geochemistry), however, the mechanisms of the interaction of microorganisms within the anammox communities that can be used to regulate nitrogen removal processes remain poorly understood.

A metagenomic analysis of the anammox community from a functioning bioreactor revealed that the anammox bacteria themselves cannot synthesize folic acid (an intermediate for the synthesis of nucleic acids) and formate (an important secondary metabolite necessary for autotrophic growth). We suggested that the addition of these metabolites should positively affect the growth and stability of the anammox community, which was the purpose of this work.

For cultivation and comparative study of the influence of various factors on the properties of the anammox community, a bioreactor block was constructed consisting of three parallel lines, each of which was a cyclic reactor (SBR type, sequencing-batch reactor) with a working volume of 4.5 l, a cylindrical shape of polymethylmethacrylate; the method of retaining biomass (activated sludge) is fixing on a nonwoven material made of polyethylene filaments of the type of Irrigation (LLC "Etek", Kaluga). The operation of the reactor (control of fluid flows, air supply, temperature control) was fully automated. The reactor is inoculated with activated sludge, originally originating from the Anammox semi-industrial reactor for purifying the filtrate from dehydration of the fermented sewage sludge at the Lyubertsy WWTP of Mosvodokanal JSC, and subsequently adapted (cultivated) in the laboratory reactor.

A metagenomic analysis carried out during the functioning of the bioreactor revealed the dominant microorganisms of the anammox community, as well as a change in their quantities during adaptation and growth in the reactor.

After achieving sustainable removal of more than 80% nitrogen with a moderate nitrogen load, the microbial community of activated sludge was subjected to a stress load - a sharp twofold increase in the concentration of ammonia, which is a stressor for anammox bacteria (Aktan et al., 2012; Xie et al., 2017). As a result, the performance of the control reactor for nitrogen removal decreased by 25% and recovered to its original level only after 20 days. In the presence of folate, the rate of nitrogen removal remained at the initial level with a tendency to increase, while in the presence of formate, the rate of nitrogen removal decreased as in the control, but after 20 days it increased to the level of 120% of the initial one.

It was also shown that the presence of these metabolites significantly accelerates the adhesion of activated sludge anammox on polyethylene - if complete control sludge adhesion took 4 weeks, then in the presence of folate or formate - 2 weeks.

The results obtained allow us to conclude that folate and formate can be used to increase the stability and efficiency of the functioning of Anammox bioreactors for wastewater treatment.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project No. 18-29-08008) and the state assignment (goszadanie) of the Federal Research Center for Biotechnology.

References

1. van Niftrik L., Jetten M.S.M. *Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: unique microorganisms with exceptional properties.* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012. V. 76. P. 585-596.
2. Devol A.H. *Denitrification, Anammox and N₂ Production in Marine Sediments.* // *Annu. Rev. Mar. Sci.* 2015.7: 403-423.
3. Kallistova A.Yu., Dorofeev A.G., Nikolaev Yu.A., Kozlov M.N., Kevbrina M.V., Pimenov N.V. *The role of anammox bacteria in wastewater treatment from nitrogen compounds* // *Microbiology.* 2016.V. 85. No. 2. C. 126-144.
4. Aktan C.K., Yapsakli K., Mertoglu B. *Inhibitory effects of free ammonia on Anammox bacteria.* // *Biodegradation* 2012. 23(5):751-762.
5. Xie H., Ji D., Zang L. *Effects of Inhibition Conditions on Anammox process* // *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 2017, 100, 012149.

БИОЭКОНОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ КВАНТОВОЙ БЛОКЧЕЙН-СТЕГАНОГРАФИИ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА И ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЙ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ В РЕГИОНАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕСПИЛОТНЫХ КОМПЛЕКСОВ И ПИЛОТИРУЕМЫХ СИСТЕМ

Раткин Л.С.

ФГУ ФНЦ «Научно-исследовательский институт системных исследований Российской академии наук», Москва, Россия
117218, Москва, Нахимовский проспект, 36, к.1
e-mail: Rathkeen@bk.ru

Представлены биоэкономические разработки, позволяющие применять квантовую блокчейн-стеганографию для анализа экологической ситуации в регионах, оперативного экомониторинга в Федеральных округах и предотвращения загрязнений окружающей среды в регионах. Квантовая блокчейн-стеганография используется для обработки данных с беспилотных комплексов и пилотируемых систем.

Ключевые слова: биоэкономика, блокчейн-технологии, квантовая стеганография, экология, предотвращение загрязнений окружающей среды, обработка данных, беспилотные комплексы, пилотируемые системы.

В 2020 году произошло несколько масштабных экологических катастроф в российских регионах, суммарный ущерб от которых, по предварительным оценкам, исчисляется в миллиардах рублей. Для минимизации рисков от загрязнений окружающей среды предлагается технология квантовой блокчейн-стеганографии, позволяющая существенно сократить время обработки данных при анализе информационных массивов, получаемых с беспилотных комплексов и пилотируемых систем [1]. Совокупная стоимость владения технологией квантовой блокчейн-стеганографии [2], по оценкам экспертов, на порядок меньше минимальной оценки экономического ущерба российским регионам в 2020 году.

Технология квантовой блокчейн-стеганографии работает следующим образом: пусть имеется N_1 беспилотных комплексов (БК) для подводного экологического мониторинга (ЭМ), N_2 БК для водного ЭМ, N_3 БК для сухопутного ЭМ, N_4 БК для подземного ЭМ, N_5 БК для авиационного ЭМ, N_6 БК для космического ЭМ, N_7 БК для внутритрубного ЭМ (т.н. беспилотных «внутритрубных снарядов»). Также пусть имеется M_1 пилотируемых систем (ПС) для подводного ЭМ, M_2 ПС для водного ЭМ, M_3 ПС для сухопутного ЭМ, M_4 ПС для подземного ЭМ, M_5 ПС для авиационного ЭМ, M_6 ПС для космического ЭМ, M_7 ПС для внутритрубного ЭМ (т.н. пилотируемых «внутритрубных снарядов») [3-4]. Технология квантовой блокчейн-стеганографии позволяет строить вертикальные (космос-авиация-сухопутные-водные-подводные-подземные-внутритрубные) и горизонтальные (БК-ПС) каналы получения данных, сопоставлять информационные массивы, полученные из разных источников по объекту (группе объектов) одного региона или Федерального округа, выявлять явные и скрытые взаимосвязи в данных от $N_1 + N_2 + N_3 + N_4 + N_5 + N_6 + N_7$ БК и $M_1 + M_2 + M_3 + M_4 + M_5 + M_6 + M_7$ ПС, рассчитывать коэффициенты корреляции и ковариации и уточнять оценки ущерба окружающей среде с учетом биоэкономических особенностей Субъектов Федерации РФ [5-6]. Технология защищена патентом на изобретение в РФ и за рубежом [7].

Литература

1. Башаров А.М., Горбачев В.Н., Трубилко А.И. Один протокол квантовой стеганографии на основе перепутанных состояний W-класса // Оптика и спектроскопия. 2012. Т.112. № 3. С.361.
2. Раткин Л.С. Квантовая стеганография и квантовые суперкомпьютеры и их применение для минимизации рисков производства продукции: «Новая экономика» наноиндустрии // В книге: VIII ежегодная конференция Нанотехнологического общества России. Сборник тезисов. Научное издание. Ответственный редактор Д.С.Андреюк. 2017. С.228-231.
3. Раткин Л.С. Квантовая стеганография для суперкомпьютерных приложений для расчета технических характеристик и финансово-экономических параметров инвестиционных проектов транспортных предприятий // Транспорт: наука, техника, управление. Научный информационный сборник. 2017. № 3. С.51-55.
4. Степанова Д.И. Цифровые технологии: новая промышленная революция. В сборнике: Проблемы и перспективы развития промышленности России. Сборник материалов Второй Международной научно-практической конференции «Предприятия в условиях цифровой экономики: риски и перспективы». 2018. С. 322-327.

5. Раткин Л.С. Технологии CALS и CASE в квантовой стеганографии и квантовых суперкомпьютерах при производстве изделий на предприятиях ракетно-космической отрасли // В книге: XLI Академическое чтения по космонавтике. Сборник тезисов чтений, посвященные памяти академика С.П.Королева и других выдающихся отечественных ученых – пионеров освоения космического пространства. 2017. С. 252-253.
6. Степанова Д.И. Смарт-контракт и технология блокчейн в развитии бизнеса и экономики. В сборнике: Проблемы и перспективы развития промышленности России. Сборник материалов Второй Международной научно-практической конференции «Предприятия в условиях цифровой экономики: риски и перспективы». 2018. С. 313-321.
7. Раткин Л.С. Патент на изобретение РФ № 2322693.

UDK 621.039.75 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-321-323

BIOLOGICAL ECONOMICAL ASPECTS OF USAGE OF QUANTUM BLOCKCHAIN-STEGANOGRAPHY FOR ECOLOGICAL MONITORING AND PREVENTION OF REGIONAL ENVIRONMENTAL POLLUTION WITH THE APPLICATIONS OF UNMANNED COMPLEXES AND PILOTED SYSTEMS

L. Rathkeen

FSE FSC «Scientific Research Institute for System Researching of Russian Academy of Sciences», Moscow, Russia
 117218, Moscow, Nachimovsky prospect, 36, b.1
 e-mail: Rathkeen@bk.ru

The biological economical products for quantum blockchain-steganography for analyzing of ecological situation in the regions, operating ecological monitoring in the Federal Districts and prevention of regional environmental pollution are presented. Quantum blockchain-steganography is used for unmanned complexes and piloted systems data treatment

Key words: biological economy, blockchain-technologies, quantum steganography, ecology, prevention of environmental pollution, data treatment, unmanned complexes, piloted systems.

In 2020 were a few ecological catastrophes in Russian regions, the total damage of which, according expert opinion, is over than 1 billion of rubles. For risks minimization from environmental pollution is presented the technology of quantum blockchain-steganography, which may seriously reduce the time of data treatment during the analyzing of information arrays from unmanned complexes and piloted systems [1]. Total cost of technology of quantum blockchain-steganography [2], according expert meanings, is less than minimal damage for Russian regions in 2020.

Technology of quantum blockchain-steganography works the same way: let we have N_1 Unmanned Complexes (UC) for submarine Ecological Monitoring (EM), N_2 UC for water EM, N_3 UC for land EM, N_4 UC for underground EM, N_5 UC for aviation EM, N_6 UC for space EM, N_7 UC for in-tube EM («in-tube» UC). Let we have also M_1 Piloted Systems (PS) for submarine EM, M_2 PS for water EM, M_3 PS for land EM, M_4 PS for underground EM, M_5 PS for aviation EM, M_6 PS for space EM, M_7 PS for in-tube EM («in-tube» PS) [3-4]. Technology of quantum blockchain-steganography provides the construction of vertical (space-aviation-land-water-submarine-underground-in-tube) and horizontal (UC-PS) channels for data treatment, comparing of information arrays, produced from different resources of object (group of objects) of region or Federal District, defining of real and hidden relations in data from $N_1 + N_2 + N_3 + N_4 + N_5 + N_6 + N_7$ UC and $M_1 + M_2 + M_3 + M_4 + M_5 + M_6 + M_7$ PS, calculate the coefficients of correlation and covariance and define the environmental damage according the biological and economical features of Russian regions [5-6]. Technology is protected by patent on invention in Russia and foreign countries [7].

References

1. Basharov A.M., Gorbachev V.N., Trubilko A.I. One protocol of quantum steganography based on entanglement states of W-class // *Optics and spectroscopy*. 2012. V.112. № 3. P.361.
2. Rathkeen L.S. Quantum steganography and quantum supercomputers and its applications for minimization of risks of industrial production: «New economy» of nanoindustry// In the book: VIII Conference of Nanotechnological society of Russia. Thesis book. Scientific edition. Edited by D.S.Andreyuk. 2017. P.228-231.
3. Rathkeen L.S. Quantum steganography for supercomputer applications for calculating of technical characteristics and financial and economical parameters of investment projects of transport enterprises // *Transport: Science, Technique, Control. Scientific information edition*. 2017. № 3. PP.51-55.

4. Stepanova D.I. *Digital technologies: new industrial revolution. In the book: Problems and perspectives of development of Russian industry. The collector of materials of the Second International scientific and practical conference «Enterprises in conditions of digital economy: risks and perspectives».* 2018. PP. 322-327.
5. Rathkeen L.S. *CALS и CASE technologies for quantum steganography and quantum computing for producing on the rocket and space enterprises // In the book: XLI Academician Readings for Space Researching. The collector of thesis, dedicated to the memory of academician S.P.Korolev and other famous inner scientists – pioneers of developing of space researching.* 2017. PP. 252-253.
6. Stepanova D.I. *Smart-contract and blockchain technology in the developing of business and economy. In the book: Problems and perspectives of developing of Russian industry. Collector of materials of the Second International scientific and practical conference «Enterprise in conditions of digital economy: risks and perspectives».* 2018. PP. 313-321.
7. Rathkeen L.S. *Russian patent on invention № 2322693.*

УДК 579.66 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-323-325

ПОДБОР КОНСОРЦИУМОВ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ МОНОАРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ

Файзулина Э.Р., Айткельдиева С.А., Татаркина Л.Г., Алимбетова А.В., Ауэзова О.Н., Спанкулова Г.А.

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан
050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 105
e-mail: ecomicrolab@gmail.com

Подобраны консорциумы углеводородокисляющих микроорганизмов, эффективно деградирующие смесь изомеров ксилола. Через 24 ч культивирования остаточное содержание о-ксилола в среде составило 6,1-12,7%, м-ксилола – 4,5-10,2%, п-ксилола – 10,2-20,2%.

Ключевые слова: моноароматические углеводороды, о-, м-, п-ксилол, консорциум микроорганизмов, биомасса, деструкция

Моноароматические углеводороды, такие как бензол, толуол, этилбензол и ксилол, представляют собой важный класс экологических загрязняющих веществ из-за их признанной токсичности для разных организмов, мутагенных и канцерогенных свойств. Они широко используются в качестве растворителей и сырья для производства пестицидов, пластмасс, синтетических волокон, красок и фармацевтических препаратов, помимо присутствия в больших количествах в ископаемом топливе, что определяет загрязнение атмосферы, почвы и воды.

Известно, что биологические способы очистки природной среды наиболее безопасны, эффективны и менее затратны по сравнению с методами химической и физической очистки. К превращениям ароматических углеводородов способны различные живые организмы, но только бактерии окисляют ПАУ с последующей ассимиляцией образующихся продуктов. По видовому составу ключевые микроорганизмы различаются в зависимости от условий конкретного загрязненного участка. Поэтому использование нескольких микроорганизмов, способных к биодegradации одних и тех же органических загрязнителей, повышает вероятность успешной биоремедиации, поскольку более вероятно, что хотя бы один микроорганизм проявит хорошую приспособляемость и жизнеспособность на конкретном загрязненном участке.

Из нефтезагрязненных почв Западного Казахстана методом накопительных культур были выделены штаммы бактерий, растущие на п-, м- или о-ксилоле. На основании определения антагонистической активности было составлено 4 консорциума, в которые входили бактерии родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*. При этом в каждый консорциум входили культуры, деградирующие один из изомеров ксилола. Изучен их рост в жидкой минеральной среде со смесью п-, м- и о-ксилола, которые вносили по 1 мл/л каждого. Установлено, что у консорциумов 1, 2 и 3 стационарная фаза роста наступала через 12 ч культивирования, а у консорциума 4 – через 18 ч. Наибольший рост наблюдался у консорциума 4, биомасса которого возрастала в 4,8 раза. У консорциумов 2 и 3 оптическая плотность культуральной жидкости увеличивалась в 3,2 и 3,7 раза соответственно. Менее активным был консорциум 1.

Изучена деструкция смеси изомеров ксилолов под воздействием консорциумов 2, 3 и 4. Результаты исследования показали их высокую активность. Через 24 ч культивирования остаточное содержание о-ксилола в среде составило 6,1-12,7%, м-ксилола – 4,5-10,2%, п-ксилола – 10,2-20,2% (рис. 1). Естественная убыль субстратов составила 2-6%.

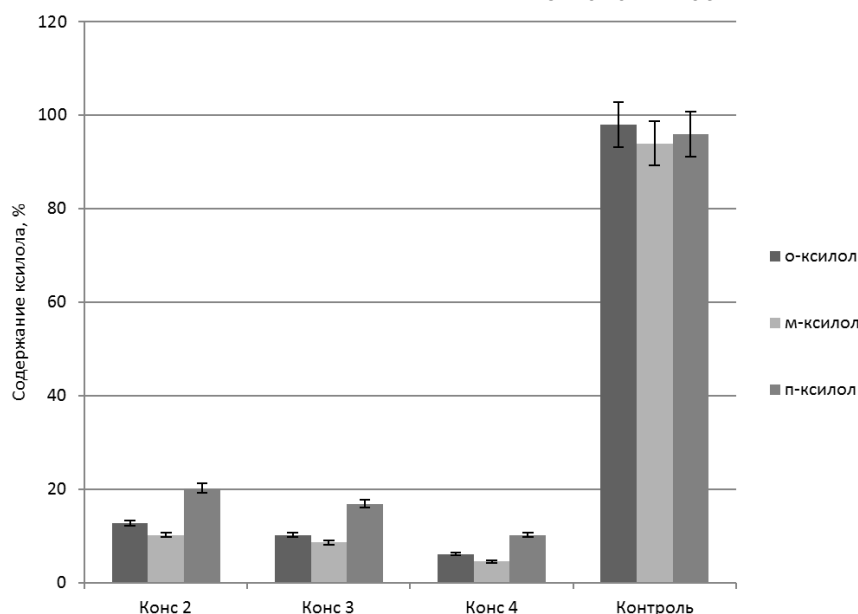


Рис. 1. Деструкция смеси изомеров ксилола активными консорциумами

Наибольшую активность показал консорциум 4, который утилизировал 89,8-95,5% изомеров ксилола. В его состав входили четыре штамма бактерии видов *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. tropicus*. Поскольку из нефтезагрязненных почв в основном были выделены бациллярные формы, возможно они обладали большей устойчивостью и активностью по отношению к исследуемым субстратам. Вероятно, с этим связана наибольшая деструкционная способность этого консорциума.

Работа выполнена в рамках проекта № AP05132069 при финансировании МОН РК.

UDC 579.66 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-323-325

SELECTION OF CONSORTIA OF MICROORGANISMS-DESTRUCTORS OF MONOAROMATIC HYDROCARBONS

Faizulina E.R., Aitkeldiyeva S.A., Tatarkina L.G., Alimbetova A.V., Auezova O.N., Spankulova G.A.

LLC «Research and Production Center for Microbiology and Virology», Almaty, Kazakhstan
 050010, Almaty, Bogenbay batyr str., 105
 e-mail: ecomicrolab@gmail.com

Hydrocarbon-oxidizing microorganisms capable to grow on fluorene have been isolated from oil-polluted soils of the Western Kazakhstan. The destruction of the investigated substrate by these cultures was studied. The most active strains almost completely utilized fluorene in 15 days.

Key words: monoaromatic hydrocarbons, o-, m-, p-xylene, consortia of microorganisms, biomass, destruction

Monoaromatic hydrocarbons such as benzene, toluene, ethylbenzene and xylene represent an important class of environmental pollutants due to their recognized toxicity to various organisms, mutagenic and carcinogenic properties. They are widely used as solvents and raw materials for the production of pesticides, plastics, synthetic fibers, paints and pharmaceuticals, in addition to the presence of large quantities in fossil fuels, which determines the pollution of the atmosphere, soil and water.

It is known that the biological methods of cleaning the environment are the safest, most effective and less expensive in comparison with methods of chemical and physical treatment. Various living organisms are capable of transforming aromatic hydrocarbons, but only bacteria oxidize PAHs with subsequent assimilation of the resulting products. In species composition, key microorganisms are different depending on the conditions of a specific contaminated site. Therefore, the use of several microorganisms capable of biodegradation of the same organic pollutants increases the chance of successful bioremediation, since it is more likely that at least one microorganism will show good adaptability and viability in a particular contaminated area.

Bacterial strains growing on p-, m- or o-xylene were isolated from oil-contaminated soils of Western Kazakhstan by the method of enriched cultures. Based on the determination of antagonistic activity, 4 consortia were formed, which included bacteria of the genera *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*. At the same time, each consortium included cultures degrading one of the xylene isomers. Their growth was studied in a liquid mineral medium with a mixture of p-, m- and o-xylene, which introduced 1 ml/l of each. It was established that in consortia 1, 2, and 3, the stationary growth phase began after 12 hours of cultivation, and in consortium 4 after 18 hours. The highest growth was observed in consortium 4, whose biomass increased 4.8 times. In consortia 2 and 3, the optical density of the culture fluid increased by 3.2 and 3.7 times, respectively. The consortium 1 was less active.

The destruction of a mixture of xylene isomers under the influence of consortia 2, 3, and 4 was studied. The results of the study showed their high activity. After 24 hours of cultivation, the residual content of o-xylene in the medium was 6.1-12.7%, m-xylene - 4.5-10.2%, p-xylene - 10.2-20.2% (Fig. 1). The natural loss of substrates was 2-6%.

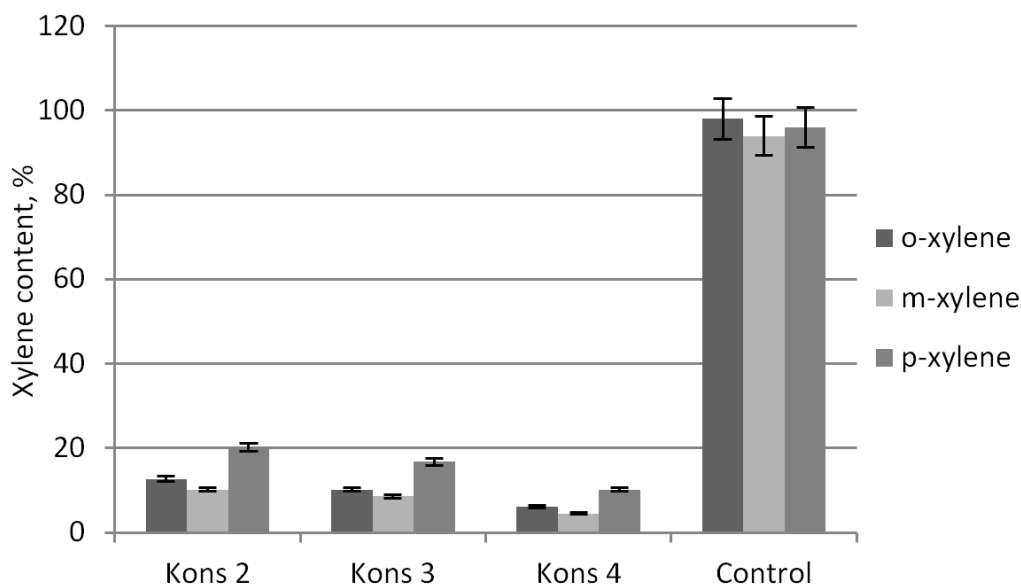


Fig. 1. Destruction of a mixture of xylene isomers by active consortia

Consortium 4 showed the highest activity, it utilized 89.8-95.5% of xylene isomers. It consisted of four bacterial strains of the species *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. tropicus*. Since bacillary forms were mainly isolated from oil-contaminated soils, they probably possessed greater stability and activity in relation to the studied substrates. Probably, the largest destruction ability of this consortium is associated with this.

The work was carried out within the framework of the project No AP05132069 with the financing of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

УДК 575.224.4 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-325-328

ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* С ДВОЙНЫМ МУТАНТОМ *RAD2ΔHSM3Δ* К МЕТИЛМЕТАНСУЛЬФОНАТУ

Федоров А.А., Алексеева Е.А., Королев В.Г.

ФГБУ "Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра "Курчатовский институт", Гатчина, Россия
188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, мкр. Орлова роща, д.1
e-mail: sashaf19956@gmail.com

Изучена чувствительность штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с двойным мутантом *rad2Δhsm3Δ* к генотоксикантам на примере метилметансульфоната, а также его влияние на возможность спонтанного мутагенеза, и дальнейшее использования штамма как теста на определение генотоксикантов в окружающей среде.

Ключевые слова: чувствительность; спонтанный мутагенез; *hsm3*; *rad2*; метилметансульфонат, генотоксиканты.

В лаборатории генетики эукариот Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова был получен новый штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с двойной мутацией по генам *RAD2* и *HSM3*, который должен фиксировать присутствие генотоксикантов в окружающей среде. Дабы подтвердить это были проведены эксперименты с генотоксикантом на примере метилметансульфоната.

Метилметансульфонат (сокр. ММС) - супермутagen [4], повреждающий ДНК путем алкилирования пуриновых оснований и затем приводящий к транзиции [2]. Является возбудителем хромосомных aberrаций [1].

Ген *HSM3* (от англ. enHanced Spontaneous Mutability) - ген, контролирующий минорную ветвь системы коррекции неправильно спаренных оснований. Показано, что мутация в гене *HSM3* блокирует этот путь репарации. Данный ген фиксирует мутагенное, летальное и рекомбиногенное действие различных химических, биологических и физических агентов [3].

Ген *RAD2* (от англ. RADiation sensitivity) - ген, участвующий в нуклеотидэксцизионной репарации (NER) и транскрипции с промотора РНК-полимеразы II. Мутации в данном гене делают его суперчувствительным к ультрафиолетовому излучению и к большому спектру химических агентов [3].

Благодаря мутациям в этих генах, штамм можно использовать как тест для идентификации генотоксикантов в окружающей среде.

Для подтверждения этого, мы провели эксперименты на чувствительность штамма к ММС. Для этого мы выдерживали суспензию клеток в пробирках с ММС в разной концентрации: 10 мкл/мл; 25 мкл/мл; 50 мкл/мл и 100 мкл/мл в течение 30 минут. Затем, полученную суспензию разбавляли в 10 раз и отпечатывали на питательную среду с канаванином по методу Хромова-Борисова. Через 2 недели производили подсчет колоний вторичных мутантов и клеток. Подсчет клеток производили в камере Горяева. Эксперимент проводили в трех повторностях. Результаты вычислений и статистической обработки вы можете наблюдать в таблице 1.

Таблица 1. Подсчет вторичных мутантов и клеток

| Количество ММС | Количество колоний вторичных мутантов | Количество клеток в камере Горяева |
|----------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| 10 мкл/мл | 89,75 ± 0,25 | 0,75 × 10 ⁶ |
| 25 мкл/мл | 112,32 ± 0,58 | 0,95 × 10 ⁶ |
| 50 мкл/мл | 234,15 ± 0,27 | 1,6 × 10 ⁶ |
| 100 мкл/мл | 185,64 ± 0,86 | 1,15 × 10 ⁶ |

Для подтверждения нашей теории провели аналогичный эксперимент на клетках штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа. Результаты эксперимента приведены в таблице 2.

Таблица 2. Подсчет вторичных мутантов и клеток в штамме дрожжей дикого типа

| Количество ММС | Количество колоний вторичных мутантов | Количество клеток в камере Горяева |
|----------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| 10 мкл/мл | 16,31 ± 0,31 | 0,82 × 10 ⁶ |
| 25 мкл/мл | 27,54 ± 0,25 | 1,1 × 10 ⁶ |
| 50 мкл/мл | 58,48 ± 0,16 | 1,26 × 10 ⁶ |
| 100 мкл/мл | 119,63 ± 0,46 | 1,35 × 10 ⁶ |

Исходя из представленных данных, можно сказать, что штамм *rad2Δhsm3Δ* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, весьма чувствителен к ММС, о чем говорит увеличение количества клеток и увеличивает возможность спонтанного мутагенеза, о чем говорит количество колоний вторичных мутантов.

Литература

1. Агзамова Г.С. Изменения в клетках периферической крови у людей под воздействием различных химических веществ (первое сообщение). 2010.
2. Ильин Д. Ю., Ильина Г. В., Сашенкова С. А. Г.А.А. Приемы селекции организмов-продуцентов целлюлаз, перспективных в биоконверсии отходов сельскохозяйственного производства // Нива Поволжья. 2019. № 52 (3). С. 97–105.
3. Черненко А.Ю. Изучение летального, мутагенного и рекомбиногенного действия цис-платины на клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // VI Международный конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». 2012.
4. Эмедова Т. А., Мишенина С. В., Мадонов П. Г., Боровская Т. Г., Вычужанина А. В. Изучение канцерогенности иммобилизованных субтилизинов методом ДНК-комет // Медицина и образование в Сибири. 2015. (6). С. 2–8.

STUDY OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* YEAST STRAIN SENSITIVITY WITH DOUBLE MUTANT *RAD2ΔHSM3Δ* TO METHYLMETHANESULPHONATE

Fedorov A.A., Alekseeva E.A., Korolev V.G.

FSBI Petersburg Institute of Nuclear Physics named after BP Konstantinov of the National Research Center Kurchatov Institute, Gatchina, Russia

188300, Leningrad Region, Gatchina, microdistrict. Orlova Roscha, 1

e-mail: sashaf19956@gmail.com

The sensitivity of the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* with the double mutant *rad2Δhsm3Δ* to genotoxicants was studied using methyl methanesulfonate as an example, as well as its influence on the possibility of spontaneous mutagenesis, and further use of the strain as a test for determining genotoxicants in the environment.

Key words: sensitivity; spontaneous mutagenesis; *hsm3*; *rad2*; methyl methanesulfonate, genotoxicants.

In the eukaryotic genetics laboratory, St. Petersburg Institute of Nuclear Physics B.P. Konstantinova, a new strain of yeast *Saccharomyces cerevisiae* with the double mutant *rad2Δhsm3Δ* was obtained, which should record the presence of genotoxicants in the environment. In order to confirm this, experiments were carried out with a genotoxicant using methyl methanesulfonate as an example.

Methyl methanesulfonate (abbr. MMS) is a supermutagen [4] that damages DNA by alkylation of purine bases and then leads to transition [2]. It is the causative agent of chromosomal aberrations [1].

HSM3 gene (from the English enHanced Spontaneous Mutability) is a gene that controls the minor branch of the correction system for incorrectly paired bases. It was shown that a mutation in the *HSM3* gene blocks this repair pathway. This gene captures the mutagenic, lethal and recombinogenic effects of various chemical, biological and physical agents [3].

The *RAD2* gene (from the English *RADI*ation sensitivity) is a gene involved in nucleotide excision repair (NER) and transcription from the RNA polymerase II promoter. Mutations in this gene make it supersensitive to ultraviolet radiation and to a wide range of chemical agents [3].

Due to mutations in these genes, the strain can be used as a test to identify genotoxicants in the environment.

To confirm this, we conducted experiments on the sensitivity of the strain to MMS. To do this, we maintained a suspension of cells in tubes with MMS in different concentrations: 10 µl/ml; 25 µl/ml; 50 µl/ml and 100 µl/ml for 30 minutes. Then, the resulting suspension was diluted 10 times and dispersed into culture media with a canavanine according to the Khromov-Borisov method. After 2 weeks, colony counts of secondary mutants and cells were counted. Cell counting was performed in the Goryaev chamber. The experiment was carried out in triplicate. The results of calculations and statistical processing you can see in table 1

Table 1. Counting secondary mutants and cells

| Volume of MMS's | Number of colonies of secondary mutants | Number of cells in the Goryaev chamber |
|-----------------|---|--|
| 10 µl / ml | 89,75 ± 0,25 | 0,75 × 10 ⁶ |
| 25 µl / ml | 112,32 ± 0,58 | 0,95 × 10 ⁶ |
| 50 µl / ml | 234,15 ± 0,27 | 1,6 × 10 ⁶ |
| 100 µl / ml | 185,64 ± 0,86 | 1,15 × 10 ⁶ |

To confirm our theory, a similar experiment was carried out on cells of the wild-type *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain. The experimental results are shown in table 2.

Table 2. Counting of secondary mutants and cells in the wild-type yeast strain

| Volume of MMS's | Number of colonies of secondary mutants | Number of cells in the Goryaev chamber |
|-----------------|---|--|
| 10 µl / ml | 16,31 ± 0,31 | 0,82 × 10 ⁶ |
| 25 µl / ml | 27,54 ± 0,25 | 1,1 × 10 ⁶ |
| 50 µl / ml | 58,48 ± 0,16 | 1,26 × 10 ⁶ |
| 100 µl / ml | 119,63 ± 0,46 | 1,35 × 10 ⁶ |

Based on the presented data, it can be said that the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* with the double mutant *rad2Δhsm3Δ* is very sensitive to MMS, as evidenced by an increase in the number of cells and increases the possibility of spontaneous mutagenesis, as evidenced by the number of colonies of secondary mutants.

References

1. Agzamova G.S. *Changes in peripheral blood cells in humans under the influence of various chemicals (first report)*. 2010.
2. Ilyin D. Yu., Ilyina G.V., Sashenkova S.A. G.A.A. *Methods for the selection of cellulase producing organisms promising in the bioconversion of agricultural waste // Niva Volga*. 2019. No 52 (3). С. 97-105.
3. Chernenkov A. Yu. *Study of the lethal, mutagenic and recombinogenic effects of cis-platinum on the yeast cells of Saccharomyces cerevisiae // VI International Congress "Weak and Ultra-Weak Fields and Radiations in Biology and Medicine"*. 2012.
4. Emedova T. A., Mishenina S. V., Madonov P. G., Borovskaya T. G., Vychuzhanina A. V. M. A.V. *The study of the carcinogenicity of immobilized subtilisins by the method of DNA comets // Medicine and Education in Siberia*. 2015. (6). С. 2–8.

УДК 579.222; 579.6; 579.64:631.46 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-328-330

БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ОЧИСТКИ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ОТ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ В УСЛОВИЯХ УМЕРЕННОГО И ХОЛОДНОГО КЛИМАТА

Филонов А.Е.^{1,2}, Пунтус И.Ф.¹, Ахметов Л.И.¹, Ветрова А.А.¹, Линников С. В.³, Боронин А.М.¹

¹ Обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пушкино, Россия
 142290 Россия, Московская область, Пушкино, проспект Науки 5
 e-mail: filonov.andrey@rambler.ru

² ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, Тула, Россия

³ ООО «Сонес», Москва, Россия

Ключевые слова: биодegradация; биоремедиация; нефть; биопрепараты; микроорганизмы; холодный климат.

В России большинство месторождений нефти и загрязненных нефтью территорий расположено в северных регионах. Работы в направлении фито- и биоремедиации проводятся во многих странах мира, однако эффективность биоремедиации при низких температурах к настоящему времени мало изучена, а проблема очистки от нефтяных загрязнений до сих пор не решена. Поэтому, особенно актуальна разработка эффективных биопрепаратов и технологий очистки от нефтяных загрязнений в условиях холодного и умеренного климата.

Для разработки биопрепаратов в лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН были выработаны критерии отбора штаммов-нефтедеструкторов. Комбинация всех перечисленных ниже свойств, наиболее значимых для эффективной деградации углеводородов нефти, не описана ни для одного из известных биопрепаратов: способность к деградации высоких концентраций нефти или нефтепродуктов (30%) в широком диапазоне температур (от 4 до 42°C); способность к деградации углеводородов при различных значениях pH (4–10); галотолерантность (до 5% NaCl); наличие катаболических плазмид; продуцирование эффективных биопрепаратов; способность к колонизации корней растений; совместимость микроорганизмов в составе ассоциации. Впервые нами было показано, что наличие плазмид биодegradации ароматических углеводородов в штаммах-хозяевах приводит к увеличению степени деструкции нефти, а горизонтальный перенос плазмид и генов биодegradации в эндогенные почвенные микроорганизмы интенсифицирует процессы очистки и повышает биодegradативный потенциал микробных популяций в загрязненных углеводородами экосистемах.

На основе проведенных исследований разработан, испытан и запатентован биопрепарат «МикроБак» (*Pseudomonas spp.*, *Rhodococcus spp.*) а также разработан опытный образец биопрепарата «ВиО» (*Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas putida* и *Rhodococcus erythropolis*) для очистки почв и грунтов от нефтяных загрязнений в условиях холодного и умеренного климата (Патент РФ №2378060). Лабораторные испытания этих биопрепаратов продемонстрировали их высокую эффективность в широком температурном (4–42°C) и pH (4–10) диапазонах и при высоком содержании нефти в почве (до 30%) по сравнению с известными коммерческими биопрепаратами. Полевые испытания биопрепарата «МикроБак» при пониженной температуре (от 0 до +22°C) показали, что за 2 месяца в зависимости от условий он способен утилизировать от 50 до 90% нефти и дизельного топлива.

Для повышения эффективности деградации нефти в почве разработаны растительно-микробные ассоциации, из которых наиболее перспективной оказалась «ВиО-ячень». В полевых испытаниях на территории нефтяных месторождений Ямало-Ненецкого автономного округа за 2 месяца при колебаниях температуры воздуха от -2 до +24°C наибольшая эффективность деградации нефти в почве наблюдалась на участке, обработанном ассоциацией «ВиО» – ячень (89%) по сравнению с ассоциациями биопрепаратов ЗАО «Биоойл» с ячемнем (70-75%).

В 2017 году совместно с компанией ООО «Сонес» был разработан новый биопрепарат «OXIDOIL» (*Sphingobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*), технологии его получения и применения для очистки от нефтяных загрязнений в условиях холодного и умеренного климата. Опытные-полевые испытания этого биопрепарата в Ямало-Ненецком автономном округе продемонстрировали его способность к деградации до 55% нефти в торфе верхового болота за 1 месяц при температуре воздуха от +2 до +23°C.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-328-330

BIOTECHNOLOGIES AND BIOPREPARATIONS FOR CLEANING THE ENVIRONMENT FROM OIL POLLUTIONS IN TEMPERATE AND COLD CLIMATES

Filonov A.E.^{1,2}, Puntus I.F.¹, Akhmetov L.I.¹, Vetrova A.A.¹, Linnikov S.V.³, Boronin A.M.¹

¹ Separate division of the Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research" Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms named after G.K. Scriabin RAS, Pushchino, Russia 142290 Russia, Moscow Region, Pushchino, Nauky Avenue 5
e-mail: filonov.andrey@rambler.ru

² FGBOU VO Tula State University, Tula, Russia

³ "Sones" LLC, Moscow, Russia

Key words: biodegradation; bioremediation; oil; biopreparations; microorganisms; cold climate.

In Russia, most oil fields and oil-contaminated territories are located in northern regions. Phyto- and bioremediation studies are carried out in many countries of the world, however, the effectiveness of bioremediation at low temperatures has so far been little studied, and the problem of cleaning the environment from oil pollution has not yet been solved. Therefore, the development of effective biopreparations and technologies for cold and temperate climates is especially relevant.

To develop biopreparations in the Laboratory of Plasmid Biology, IBPM RAS, criteria were developed for the selection of oil-degrading strains. The combination of all of the following properties, most significant for the effective degradation of oil hydrocarbons, is not described for any of the known biopreparations: the ability to degrade high concentrations of oil or oil products (30%) in a wide temperature range (from 4 to 42 °C); the ability to degrade hydrocarbons at various pH values (4–10); halotolerance (up to 5% NaCl); the presence of catabolic plasmids; production of effective biosurfactants; ability to colonize plant roots; compatibility of microorganisms in the consortium. For the first time, we have shown that the presence of plasmids encoding for biodegradation of aromatic hydrocarbons in host strains leads to an increase in the degree of oil degradation, and the horizontal transfer of plasmids and catabolic genes to indigenous soil microorganisms intensifies the biodegradation processes and increases the biodegradative potential of microbial populations in hydrocarbon-polluted ecosystems.

On the basis of the conducted studies, the MicroBak biopreparation (*Pseudomonas spp.*, *Rhodococcus spp.*) was developed, tested and patented, as well as a pilot sample of the biopreparation V&O (*Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas putida* and *Rhodococcus erythropolis*) for cleaning soil in cold and moderate climates (RU Patent No. 2378060). Laboratory tests of these biopreparations have demonstrated high efficiency in a wide temperature (4–42 °C) and pH (4–10) ranges and with a high oil content in the soil (up to 30%) in comparison with well-known commercial biopreparations. Field tests of MicroBak at low temperatures (from 0 to + 22 °C) showed that in 2 months, depending on conditions, it is able to utilize from 50 to 90% of oil and diesel fuel.

In order to increase the efficiency of oil degradation in the soil, plant-microbial associations have been developed, of which the most promising is "V&O-barley". In field trials on the territory of the oil fields of the Yamalo-Nenetsky Autonomous Region for 2 months with air temperature fluctuations from -2 to + 24 °C, the highest efficiency of oil degradation in the soil was observed in the area treated by the "V&O-barley" association (89% oil removal) compared to with associations of biopreparations JSC "Biooil" with barley (70-75% removal).

In 2017, together with "Sones" LLC, a new biopreparation OXIDOIL (*Sphingobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*,

Rhodococcus sp.) was developed, as well as technologies for its preparation and use for cleaning from oil pollution in cold and temperate climates. Field trials of this biopreparation in the Yamal-Nenetsky Autonomous Region demonstrated its ability to degrade up to 55% of oil in a peat of a bog for 1 month at an air temperature of +2 to +23 °C.

УДК 604.4 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-330-331

СКРИНИНГ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ КОРМОВЫХ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ НА ОТХОДАХ МАСЛЕНИЧНОГО ПРОИЗВОДСТВА

И.А. Фоменко, Т.П. Кузьмичева, И.Д. Бельский

ФГБОУ ВО «Московский Государственный Университет Пищевых Производств», Россия
 Москва, Волоколамское шоссе, д. 11, 125080
 e-mail: iv.fomenko@mail.ru

Установлено процентное содержание веществ, входящих в состав лузги подсолнечника. Проведен первичный скрининг 17 штаммов мицелиальных грибов на средах, имеющих в качестве источника углерода только измельченную лузгу подсолнечника. Отобраны штаммы, которые по окончании культивирования содержат свыше 50% сырого протеина, 15–20 Ед/г целлюлолитической и более 100 Ед/г ксиланазной активности.

Ключевые слова: подсолнечная лузга, целлюлаза, ксиланаза, *Trichoderma*, *Aspergillus*, биоконверсия, функциональная добавка.

Одним из лидеров мирового производства подсолнечного масла на данный момент является Российская Федерация. Так Институт Конъюнктуры Аграрного Рынка опубликовал данные о том, что в 2019 году сбор урожая семян подсолнечника на территории РФ страны составил около 15,1 млн. тонн в зачетном весе, что на 18% больше чем в 2018 г. Однако помимо получающегося основного продукта - растительного масла - в процессе производства образуется огромное количество отходов, таких как лузга, жмых или шрот.

Лузга отделяется от семян подсолнечника в процессе их подготовки к извлечению масла и представляет собой одревесневшую растительную ткань однородную по физической структуре с постоянным химическим составом и физико-механическим свойствам [1].

Именно в подсолнечных семенах лузга имеет наиболее высокую массовую долю: от 22% до 28%, что составляет сотни тысяч тонн отхода в год. В настоящее время некоторое количество подсолнечной шелухи используется в качестве сырья при производстве фурфурола и брикетов для сжигания [1].

В ходе исследования химического состава лузги подсолнечника было установлено содержание целлюлозы – 20–35 %, гемицеллюлозы – 25–30 %, лигнина – 20–27 %, уроновые кислоты – 6–9 %, липиды – 3–6 %, воски 1,5–2,5 %, протеины – 2–4 %, зола – 1,5–3,5 %. Химический состав золы подсолнечника (% к массе золы): CaO 8,0–13,0; MgO 5,0–9,0; K₂O 20,0–45,0; P₂O₅ 4,0–8,0; SiO₂ 3,0–11,0; Al₂O₃ 2,4–7,2.

Одним из вариантов промышленной биоконверсии подсолнечной лузги является культивирование мицелиального гриба с целью получения функциональной кормовой добавки, являющейся источником полноценного белка и комплексного целлюлолитического ферментного препарата в кормопроизводстве. Для первичной оценки роста и активности микроорганизмов-продуцентов на исследуемом субстрате были выбраны следующие виды мицелиальных грибов, которые культивировали как поверхностным, так и глубинным способом на средах различного состава: *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus awamori*. Первичному скринингу было подвергнуто 17 штаммов указанных видов мицелиальных грибов. Поверхностное и глубинное культивирование проводили на питательных средах, имеющих в качестве источника углерода только измельченную лузгу подсолнечника. Получена сравнительная характеристика по накоплению биомассы, содержанию сырого протеина, а так же по целлюлолитической и ксиланазной активности исследуемыми штаммами. Были отобраны 3 штамма содержащие свыше 50% сырого протеина, а так же 15–20 Ед/г целлюлолитической и более 100 Ед/г ксиланазной активности.

Исследование показало, что есть возможность использовать лузгу, как недорогой субстрат для производства функциональных кормовых добавок, содержащих комплекс ферментов с целлюлолитической и ксиланазной активностями. Данный способ переработки лузги подсолнечника может стать одним из наиболее перспективных и экономически выгодных способов ее использования из существующих на сегодняшний день.

Литература

1. Хусид С.Б., Гиеуш А. Н., Нестеренко Е.Е. Подсолнечная лузга как источник получения функциональных кормовых добавок// Политематический сетевой электронный научный журнал КГАУ.- 2015. -№ 107. -С. 142-155.

UDK 604.4 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-330-331

SCREENING OF MYCELIAL FUNGI AS POTENTIAL PRODUCERS OF FODDER CELLULOLYTIC ENZYMES ON WASTE OIL PRODUCTION

I.A. Fomenko, T.P. Kuzmicheva, I.D. Belsky

«Moscow State University of Food Production», Russia, Moscow, Volokolamskoe shosse, d. 11, 125080
e-mail: iv.fomenko@mail.ru

The percentage of substances that make up the husks of sunflower is established. Primary screening of 17 strains of mycelial fungi was carried out on media having only crushed sunflower husk as a carbon source. The strains were selected that at the end of cultivation contained more than 44% crude protein, 15–20 U/g cellulolytic and more than 100 U/g xylanase activity.

Key words: sunflower husk, cellulase, xylanase, *Trichoderma*, *Aspergillus*, bioconversion, functional additive.

One of the leaders in world production of sunflower oil at the moment is the Russian Federation. Institute for Agricultural Market Studies (IKAR) reports that in 2019 the harvest of sunflower seeds in our country amounted to about 15,1 million tons in offset weight, which is 18% more than the previous season. However, in addition to the resulting main product - vegetable oil - in the production process, a huge amount of waste is generated, such as husk, cake or meal. The husk is separated from the sunflower seeds in the process of their preparation for oil extraction and it is a lignified plant tissue homogeneous in physical structure with constant chemical composition and physico-mechanical properties [1].

Among other oilseeds crops, it is in sunflower seeds that husk has the highest mass fraction: from 22 to 28%, which amounts to hundreds of thousands of tons of waste per year. To recycle such a quantity of husks is laborious and economically unprofitable. Currently, a certain amount of sunflower husk is used as a raw material in the production of furfural, it is also briquetted for burning [1]. The use of sunflower husk as a source of protein preparations and functional feed additives for ruminants is of scientific interest.

In the course of the study of the chemical composition of sunflower husk, the cellulose content was found to be 20–35%, hemicellulose 25–30%, lignin 20–27%, uronic acids 6–9%, lipids 3–6%, waxes 1.5 - 2.5%, proteins - 2 - 4%, ash - 1.5 - 3.5%. The chemical composition of sunflower ash (% by weight of ash): CaO 8,0–13,0; MgO 5,0 – 9,0; K₂O 20,0 – 45,0; P₂O₅ 4,0 – 8,0; SiO₂ 3,0 – 11,0; Al₂O₃ 2,4 – 7,2.

One of the options for industrial bioconversion of sunflower husk is the cultivation of mycelial fungus in order to obtain a functional feed additive, which is a source of complete protein and a complex enzyme preparation that can increase the digestibility of cellulose-containing foods in the diet of domestic animals. For an initial assessment of the growth and activity of producer microorganisms on the test substrate the following types of mycelial fungi were selected, which were cultivated both by surface and deep methods on media of various compositions: *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus awamori*. The primary screening was performed on 17 strains of these types of mycelial fungi. Surface and deep cultivation was carried out on nutrient media having only crushed sunflower husk as a carbon source. A comparative characteristic was obtained for biomass accumulation, crude protein content, as well as for cellulolytic and xylanase activity of the studied strains. Three strains containing over 44% crude protein were selected, as well as 15–20 U / g cellulolytic and more than 100 U / g xylanase activity.

The study showed that strains of mycelial fungi can efficiently process sunflower husk, which makes it possible to use it as an inexpensive substrate for the production of functional feed additives containing a complex of enzymes with cellulolytic and xylanase activities. This method of processing sunflower husks can be one of the most promising and cost-effective ways of using it from existing today.

References

1. Khusid S.B., Gneush A.N., Nesterenko E.E. Sunflower husks as a source of functional feed additives. //Polythematic online electronic scientific journal of the Kuban State Agrarian University. -2015. -№ 107. -P. 142-155.

КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ – АКТИВАТОРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ АКТИВНОГО ИЛА

Чурмасова Л. А.¹, Шаненко Е. Ф.¹, Мухамеджанова Т. Г.¹, Веселков К. А.¹, Константинова А. С.¹, Рыжова О. Г.²

¹ Московский государственный университет пищевых производств
125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11 e-mail: ludmila-churmasova@yandex.ru

² Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений
105118, г. Москва, шоссе Энтузиастов, 38

Полученные данные подтвердили эффективность использования кремнийорганических соединений для активации биоокисления сточных вод. Подобранные композиции позволяют повысить эффективность очистки сточных вод и снизить расходы на биостимуляторы при повышении коммерческой привлекательности их использования.

Ключевые слова: кремнийорганические соединения; сточные воды; активный ил; биостимуляторы.

Проблема очистки сточных вод не перестает быть актуальной для предприятий пищевой промышленности. Большое количество органических отходов, высоких концентраций моющих и дезинфицирующих средств значительно повышают нагрузку на очистные сооружения. Ситуация особенно осложняется в момент аварийного сброса стоков, во время которого высокие концентрации детергентов и ингибиторов дыхания могут вызывать гибель микроорганизмов активного ила. В качестве защиты микроорганизмов от стрессовых факторов предлагается использовать различные биостимуляторы, активирующие метаболизм и повышающие резистентность клеток. Одной из перспективных групп соединений, используемых для защиты активного ила, являются кремнийорганические соединения. Наибольшую активность в отношении микроорганизмов активного ила проявляют соединения германия – герматранол, однако высокая стоимость сдерживает его широкое использование. В ряде работ показана возможность частичной замены герматранола (герматранол-гидрат – $H_2O \times HO[Ge(OCH_2CH_2)_3]N$) на соединения кремния. [1,2]

Механизм действия кремния на клетки микроорганизмов ещё не достаточно изучен. Показано, что силикагель, образующийся из ортокремниевой кислоты, обладает повышенными адгезивными свойствами, что оказывает влияние на рост и метаболизм микробных культур. Установлено, что ассимиляция кремния связана с системой дыхания и протекает в две стадии – на первой окисление субстрата, на второй накопление кремния и обмен фосфора на кремний. Часть поглощённого кремния соединяется с углеводами, образуя соединения с определённой биологической активностью. Показано, что соединения кремния влияют на проницаемость клеточной мембраны, модулируют активность ферментов и ускоряют дифференцировку клеток в культуре тканей. [3]

Целью работы являлось интенсификация биологических процессов окисления органических загрязнений сточных вод при использовании биоразлагаемых элементоорганических активаторов, содержащих кремний: октаметилциклотетрасилазана (ОМЦТС), трис(диэтиламино)силана (ТДЭАС).

Формулы исследуемых соединений могут быть представлены следующим образом: октаметилциклотетрасилазан (ОМЦТС) $[(CH_3)_2SiNH]_4$; трис(диэтиламино)силан (ТДЭАС) $HSi[N(CH_2CH_3)_2]_3$. Особенности строения молекул и высокая доля в них кремния и азота позволяют предположить наличие у этих соединений высокой биологической активности.

Исследование биологической активности соединений кремния, проводили в лабораторных условиях, моделируя процесс очистки сточных вод предприятий, перерабатывающих сельскохозяйственную продукцию в лабораторных аэротенках;

Микроорганизмы активного ила, полученные из промышленных аэротенков, выращивали на жидкой питательной среде и вносили в лабораторный аэротенк, содержащий промышленные стоки и биогенные стимуляторы. В качестве контроля использовали промышленный сток без добавок;

Эффективность кремнийорганических соединений оценивали по изменению дегидрогеназной активности культуры микроорганизмов, т.е. максимальное ускорение времени обесцвечивания метиленового синего в опытной пробе от контроля, и по количеству поглощённого кислорода, (отклонение от контроля, %) который также является косвенным показателем активности микроорганизмов активного ила.

С целью подбора композиции, стимулирующей процесс биохимической деградации органических соединений, изучалось влияние герматранола, ОМЦТС и ТДЭАС на дегидрогеназную активность микроорганизмов активного ила и на потребление растворённого кислорода. Результаты экспериментов показали,

что композиция, состоящая из компонентов герматранол и октаметилциклотетрасиланаза в соотношении 20%/80% при общей концентрации 0,015 мг/дм³ максимально повышает ферментативную активность микроорганизмов активного ила (до 20,2% по потреблению кислорода и до 20,8% по дегидрогеназной активности). Использование в композиции ТДЭАС оказалось менее эффективным. Изучение влияния повышенной концентрации сточных вод на микрофлору активного ила показало, что в активном иле опытного аэротенка сохранились крупные зооглеи, в контрольном аэротенке (без добавок активаторов) зооглеи отсутствовали, отмечено присутствие нитчатых бактерий. Таким образом полученные данные подтвердили эффективность использования кремнийорганических соединений для активации биоокисления сточных вод. Подобранные композиции позволяют повысить эффективность очистки сточных вод и снизить расходы на биостимуляторы.

Литература

1. Мухамеджанова Т.Г., Чурмасова Л.А., Индисова Г.Е., Шаненко Е.Ф. Химическая промышленность сегодня. // Биотехника и биотехнология. –2018. –№6. – С. 9-12
2. Воронков М.Г., Зенчан Г.И., Лукевиц Э.Я. Кремний и жизнь.- Рига: Зинатне. –1978. –С. 640
3. Вапиров В.В., Феоктистов В.М., Венскович А.А., Вапирова Н.В. Ученые записки петрозаводского государственного университета. // Физико-химическая биология. – 2017. –№2. – С. 95-102

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-332-334

ORGANOSILICON COMPOUNDS – PROMOTER OF ACTIVATED SLUDGE MICROORGANISMS.

Churmasova L.A.¹, Shanenko E.F.¹, Mukhamedzhanova T.G.¹, Veselkov K.A.¹, Konstantinova A.S.¹, Ryzhova O.G.²

¹ Moscow State University of Food Production 125080, Moscow, Volokolamsk highway, 11
e-mail: ludmila-churmasova@yandex.ru

² State Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds
105118, Moscow, 38 Entuziastov Highway

The data obtained confirmed the effectiveness of using organosilicon compounds to activate the biooxidation of wastewater. Selected compositions can improve the efficiency of wastewater treatment and reduce the cost of biostimulants while increasing the commercial attractiveness of their use.

Key words: organosilicon compounds; wastewater; activated sludge; biostimulants.

The problem of wastewater treatment does not cease to be relevant for food industry enterprises. A large amount of organic waste, high concentrations of detergents and disinfectants significantly increase the load on the treatment plant. The situation is getting much more complicated at the emergency discharge, during which high concentrations of detergents and respiratory inhibitors can cause the death of activated sludge microorganisms. It is proposed to use various biostimulants that activate metabolism and increase cell resistance as protection of microorganisms from stress factors. One of the promising groups of compounds used to protect activated sludge is organosilicon compounds. The most active against microorganisms of activated sludge is the germanium compound - germatranol, but its high cost inhibits its widespread use. A number of studies have shown the possibility of partial replacement of germatranol (germatranol hydrate - H₂O × HO [Ge (OCH₂CH₂)₃] N) with silicon compounds. [1,2]

The mechanism of action of silicon on the cells of microorganisms is still not well understood. It was shown that silica gel formed from orthosilicic acid has enhanced adhesive properties, which affects the growth and metabolism of microbial cultures. It has been established that the assimilation of silicon is associated with the respiratory system and proceeds in two stages: the first oxidation of the substrate, the second accumulation of silicon and the exchange of phosphorus to silicon. Part of the absorbed silicon combines with carbohydrates, forming compounds with a certain biological activity. It has been shown that silicon compounds affect the permeability of the cell membrane, modulate the activity of enzymes and accelerate the differentiation of cells in tissue culture. [3]The aim of the work was to intensify the biological processes of oxidation of organic wastewater pollution using biodegradable elementar organic activators containing silicon: octamethylcyclotetrasilazane (OMCTS), tris (diethylamino) silane (TDEAS).

The formulas of the studied compounds can be represented as follows: octamethylcyclotetrasilazane (OMCTS) [(CH₃)₂SiNH]₄; tris (diethylamino) silane (TDEAS) HSi[N(CH₂CH₃)₂]₃. The features of the molecules and the high

proportion of silicon and nitrogen in them suggest the presence of high biological activity in these compounds.

The study of the biological activity of silicon compounds was carried out in laboratory conditions, simulating the process of wastewater treatment of enterprises processing agricultural products in laboratory aeration tank;

Microorganisms of activated sludge obtained from industrial aeration tanks were grown on a liquid nutrient medium and introduced into a laboratory aeration tank containing industrial effluents and biogenic stimulants. An industrial runoff without additives was used as a control;

The effectiveness of organosilicon compounds was evaluated by the change in the dehydrogenase activity of the culture of microorganisms, i.e. the maximum acceleration of the bleaching time of methylene blue in the experimental sample from the control, and the amount of oxygen absorbed, (deviation from the control, %) which is also an indirect indicator of microorganisms of activated sludge.

In order to select a composition that stimulates the biochemical degradation of organic compounds, the effect of germatronol, OMCTS and TDEAS on the dehydrogenase activity of microorganisms of activated sludge and on the consumption of dissolved oxygen was studied. The experimental results showed that the composition consisting of the components germatronol and octamethylcyclotetrasilane in a ratio of 20% / 80% with a total concentration of 0.015 mg / dm³ maximally increases the enzymatic activity of microorganisms of activated sludge (up to 20.2% in oxygen consumption and up to 20.8% in dehydrogenase activity). The use of TDEAS in the composition was less effective. A study of the effect of increased concentration of wastewater on the microflora of activated sludge showed that large zoogles were preserved in the activated sludge of the experimental aeration tank, there were no zoogles in the control aeration tank (without activator additives), and filamentous bacteria were noted. Thus, the obtained data confirmed the effectiveness of using organosilicon compounds for the activation of wastewater biooxidation. Selected compositions can improve the efficiency of wastewater treatment and reduce the cost of biostimulants.

References

1. Mukhamedzhanova T.G., Churmasova L.A., Indisova G.E., Shanenko E.F. *Chemical industry today. // Biotechnology and biotechnology. 2018. –№6. - P. 9-12*
2. Voronkov M.G., Zenchan G.I., Lukevits E.Ya. *Silicon and life. - Riga: Zinatne. –1978. -P. 640*
3. Vapirov V.V., Feoktistov V.M., Venskovich A.A., Vapirova N.V. *Scientific notes of Petrozavodsk State University. // Physico-chemical biology. - 2017. –№2. - S. 95-102*

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В СОЗДАНИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ С УЛУЧШЕННЫМИ ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫМИ ПРИЗНАКАМИ

BIOTECHNOLOGY APPROACH TO CROP DEVELOPMENT WITH ECONOMIC CHARACTERS IN PLANT GROWING AND LIVESTOCK

Руководители

И.А. Тихонович академик РАН, директор ВНИИСХМ, декан факультета биологии СПбГУ/

I.A. Tikhonovich academician of RAS, director of FGBNU National Research Institute of Agricultural Microbiology, St. Petersburg, dean of Biology Department of SPBU

П.Н. Харченко академик РАН, д.б.н., ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии /.

N. Kharchenko academician of RAS, PhD (Biology), academician of RAS, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology

| | |
|--|-----|
| 1. ИНОКУЛЯЦИЯ СЕМЯН BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM КАК ИНСТРУМЕНТ АДАПТАЦИИ СОИ В АГРОЦЕНОЗАХ СЕВЕРНЫХ ШИРОТ РОССИИ Боме Н.А., Колоколова Н.Н., Вайсфельд Л.И. | 336 |
| INOCULATION OF BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM SEEDS AS A TOOL FOR SOYBEAN ADAPTATION IN AGROCENOSIS IN NORTHERN LATITUDES OF RUSSIA Bome N.A., Kolokolova N.N., Weisfeld L.I. | 337 |
| 2. КОРРЕКТИРОВКА ПОНЯТИЙНОГО АППАРАТА В ОБЛАСТИ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ПРОДУКТ-ОРИЕНТИРОВАННОГО ЗАКОНОДАТЕЛЬСТВА Брускин С.А. | 338 |
| ADJUSTMENT OF THE CONCEPTED APPARATUS IN THE FIELD OF GENE ENGINEERING FOR THE FORMATION OF PRODUCT-ORIENTED LEGISLATION Bruskin S.A. | 339 |
| 3. ВЫЯВЛЕНИЕ РЕАКЦИИ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ НА СПОСОБЫ И НОРМЫ ОБРАБОТКИ БИОПРЕПАРАТАМИ Горьков А.А., Павловская Н.Е., Гагарина И.Н., Горькова И.В. | 340 |
| DETERMINATION OF THE REACTION OF WINTER WHEAT ON METHODS AND RATES OF PROCESSING BY BIOLOGICAL PRODUCTS Gorkov A.A., Pavlovskaya N.E., Gagarina I.N., Gorkova I.V. | 340 |
| 4. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ВЫРАЩИВАНИЯ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ КРИОАДАПТЕРОВ Горьков А.А., Павловская Н.Е. | 341 |
| MODERN TECHNOLOGIES OF GROWING WINTER WHEAT WITH APPLICATION OF CRYOADAPTERS Gorkov A.A., Pavlovskaya N.E. | 342 |
| 5. СТЕРИЛИЗАЦИЯ СЕМЯН ИОНАМИ СЕРЕБРА И СЕРЕБРЯНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ, ПОЛУЧЕННЫМИ МЕТОДОМ «ЗЕЛЕНОЙ ХИМИИ» Желтова А.А., Попова А.С., Зайцев В.Г. | 343 |
| SEED STERILIZATION USING SILVER IONS AND SILVER NANOPARTICLES SYNTHESIZED BY GREEN CHEMISTRY METHODS Zheltova A.A., Popova A.S., Zaitsev V.G. | 344 |
| 6. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТНОГО АНАЛОГА Lc-LTP2 ЧЕЧЕВИЦЫ Коруцаева Е.Ю., Финкина Е.И., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В. | 344 |
| BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF A MUTANT ANALOG OF THE LENTIL Lc-LTP2 Korupaeva E.Yu., Finkina E.I., Melnikova D.N., Ovchinnikova T.V. | 345 |
| 7. ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ ТАБАКА С РЕДАКТИРОВАННЫМ ГЕНОМОМ: ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ВЫКЛЮЧЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНА ФИТОЕН-ДЕСАТУРАЗЫ НА РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЯ Нежданова А. В., Каминская А. М., Слугина М. А., Кочиева Е. З., Эльдаров М. А., Щенникова А. В. | 346 |
| GENERATION OF TOBACCO PLANTS WITH EDITED GENOME: EVALUATION OF THE INFLUENCE OF CANCELLED ACTIVITY OF THE PHYTOENE DESATURASE GENE ON PLANT DEVELOPMENT Nezhdanova A. V., Kamionskaya A. M., Slugina M. A., Kochieva E. Z., Eldarov M. A., Shchennikova A. V. | 348 |
| 8. ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ X-, Y-, S-, M-ВИРУСОВ И ВИРУСА СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ Семейкина А.А., Алиев В.О., Костенко С.Н., Серёгина П.К., Шпакова Н.А. | 349 |
| TEST SYSTEMS FOR RAPID DETECTION OF X-, Y-, S-, M- VIRUSES AND POTATO LEAF ROLL VIRUS Semeikina A.A., Aliev V.O., Kostenko S.N., Seryogina P.K., Shpakova N.A. | 350 |

| | |
|--|-----|
| 9. ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ СРЕДСТВА АЛКОПЕРИТ НА ОБЪЕКТАХ РАСТЕНИЕВОДСТВА | |
| Заболоцкая Т.В., Штауфен А.В., Волков М.Ю., Девришов Д.А., Блохин Ю.И..... | 351 |
| STUDY OF THE ACTIVITY OF ALCOPERIT DRUG ON PLANT GROWING OBJECTS | |
| Zabolotskaya T.V, Shtaufen A.V., Volkov M.Y., Devrishov D.A., Blokhin Y.I..... | 352 |
| 10. КОМПЛЕКСНЫЙ БИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ АУКСИНОВ. | |
| Девришов Д.А., Волков М.Ю., Блохин Ю.И., Заболоцкая Т.В., Штауфен А.В..... | 353 |
| COMPLEX BIOLOGICAL DRUG BASED ON BIOLOGICAL AUXINS. | |
| Devrishov D.A., Volkov M. Y., Blokhin Y. I., Zabolockaya T.V., Shtaufen A.V..... | 354 |
| 11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА ГЛАУКСИН НА БИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ | |
| Заболоцкая Т.В. | 354 |
| DETERMINATION OF THE TOXICITY OF THE DRUG GLAUKSIN ON BIOLOGICAL MODELS | |
| Zabolockaya T.V. | 355 |
| 12. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ПО ОБЕСПЕЧЕНИЮ СИСТЕМЫ ПРЕВЕНТИВНЫХ МЕР ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ | |
| БИОГЕННЫХ УГРОЗ ДЛЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР Яковлева И.В., Каминская А.М..... | 356 |
| DEVELOPMENT OF APPROACHES TO ENSURE A SYSTEM OF PREVENTIVE MEASURES FOR PREVENTING BIOGENIC | |
| THREATS FOR PLANT CROPS I. V. Yakovleva, A. M. Kamionskaya | 357 |
| 13. ЦВЕТОВАЯ ФОТОСИМУЛЯЦИЯ БАКТЕРИЙ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> Яценко Е.С., Затонская Л.В., | |
| Темерев С.В., Саламатин К.В., Петухов В.А., Лыков П.В., Евдокимов И.Ю., Соловьева В.В..... | 358 |
| COLOR PHOTOSIMULATION OF <i>BACILLUS SUBTILIS</i> BACTERIA Yatsenko E.S., Zatonkaya L.V., | |
| Temerev S.V., Salamatin K.V., Petukhov V.A., Lykov P.V., Evdokimov I.Yu., Solovieva V.V..... | 359 |

УДК 575.2.084; 579.64 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-336-338

ИНОКУЛЯЦИЯ СЕМЯН *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* КАК ИНСТРУМЕНТ АДАПТАЦИИ СОИ В АГРОЦЕНОЗАХ СЕВЕРНЫХ ШИРОТ РОССИИ

Боме Н.А.¹, Колоколова Н.Н.¹, Вайсфельд Л.И.²

¹ Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия
 625003, Тюмень, ул. Володарского, д. 6., e-mail: bomena@mail.ru

² Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия
 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4.

Выявлено положительное влияние штаммов клубеньковых бактерий (*Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner 1896) Jordan 1982) на структурно-функциональные признаки сои.

Ключевые слова: штаммы, клубеньковые бактерии, сорт, хлорофилл.

Для устойчивого и ресурсосберегающего сельского хозяйства решающее значение имеет расширение биоразнообразия бобовых культур. Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) может быть источником азота в органическом земледелии, введение ее в традиционный полевой севооборот позволит сэкономить минеральные азотные удобрения, а также увеличить разнообразие агроландшафтов. Перспектива выращивания сои в агроэкологических зонах Тюменской области показана в совместных исследованиях ученых Тюменского государственного университета и Университета прикладных наук (Оснабрюк, Германия) [1]. Определена эффективность инокуляции семян в климатических условиях России и Германии. Содержание белка в зерне после инокуляции было выше, чем в контроле, без ущерба для урожайности. Исследований по стратегии инокуляции в регионах с умеренным климатом недостаточно, в связи с ограниченными посевными площадями сои. На полигоне изучения генетических ресурсов растений биостанции ТюмГУ «Озеро Кучак» (Тюменская область, Нижнетавдинский район) на основе многолетних (2015-2019 гг.) данных установлено, что растения сои нуждаются в специфических клубеньковых бактериях для биологической азотфиксации (BNF). При отсутствии бактерий в почве необходима обработка семян отселектированными штаммами *Bradyrhizobium japonicum*. В наших исследованиях использованы штаммы 626а и 634б из Всероссийского НИИ сельскохозяйственной микробиологии (Санкт-Петербург). В день посева семена четырех сроков хранения (2, 3, 4, 5 лет) сорта СибНИИК 315 выдерживали в водной суспензии со штаммами (экспозиция 2 ч, при разведении 0,005 г препарата в 10 мл воды) или в дистиллированной воде (контроль).

В период формирования бобов в вариантах с бактериальными штаммами обнаружены клубеньковые бактерии на корнях (минимум на 1 растении – $4,5 \pm 0,3$ шт., максимум – $19,0 \pm 0,8$ шт.). В контроле на корнях клубеньков не образовалось, что указывает на отсутствие *Bradyrhizobium* в дерново-подзолистой почве опытного участка. Изменение хлорофилла в клетках листьев по стадиям фенологического развития использовали как индикатор BNF и определяли с помощью Minolta SPAD-502. В вариантах опыта на момент подсчета клубеньков показатель хлорофилла составил $40,9 \pm 1,43$ (штамм 626a) и $46,1 \pm 1,28$ (штамм 634б) ед. spad (в контроле показатель хлорофилла $35,1 \pm 1,31$ ед. spad был достоверно ниже). После инокуляции на растениях формировалось на 23,2-54,1% бобов больше, чем в контроле. Максимальная урожайность семян достигала $408 \pm 19,7$ г/м² (штамм 626a) и $460 \pm 18,8$ г/м² (штамм 634б), превышение над контролем составило 22,0% и 30,9% соответственно.

Учитывая возрастающий спрос на генетически немодифицированную сою в будущем, большое внимание уделяем экологическому изучению сортов [2]. По результатам комплексных оценок и многократных отборов выделен перспективный селекционный материал, максимально приспособленный к контрастным почвенно-климатическим факторам. Vegetационный период сортов, устойчивых к холодовому стрессу, можно существенно сократить за счет раннего срока посева (первая декада мая). Анализ изменчивости признаков сортов различного географического диапазона под влиянием метеорологических факторов позволяет правильно использовать генетическое разнообразие растений и разработать стратегию их адаптации к климатическим изменениям.

Литература

1. Kühling I., Hüsing B., Bome N., Trautz D. (2018) Soybeans in high latitudes: effects of *Bradyrhizobium* inoculation in Northwest Germany and southern West Siberia. *Organic Agriculture* 8 (2): 159-171. doi:10.1007/s13165-017-0181-y.
2. Боме Н.А., Гальчинская Т.И. Возделывание сои в условиях юга Тюменской области / Зернобобовые культуры – развивающееся направление в России. Первый международный форум, 19-22 июля 2016 г. Омск, 2016. С. 28-31.

UDK 575.2.084; 579.64 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-336-338

INOCULATION OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* SEEDS AS A TOOL FOR SOYBEAN ADAPTATION IN AGROCENOSIS IN NORTHERN LATITUDES OF RUSSIA

Bome N.A.¹, Kolokolova N.N.¹, Weisfeld L.I.²

¹ Tyumen State University, Tyumen, Russia
625003, Tyumen, 6, St. Volodarsky, e-mail: bomena@mail.ru

² Institute of Biochemical Physics named after N.M. Emanuel RAS, Moscow, Russia
119334, Moscow, St. Kosygin, 4.

The positive effect of strains of nodule bacteria (*Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner 1896) Jordan 1982) on the structural and functional characteristics of soy has been revealed.

Key words: strains, nodule bacteria, cultivar, chlorophyll

Enhancing the biodiversity of legumes is critical for sustainable and resource-saving agriculture Soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.) can serve as a source of nitrogen in organic farming, its introduction in traditional crop rotation will save mineral nitrogen fertilizers and increase the diversity of agricultural landscapes. The prospect of growing soybeans in different agroecological zones of the Tyumen region are shown in joint research by scientists from Tyumen State University and the University of Applied Sciences (Osnabruck, Germany) [1]. The efficiency of seed inoculation in the climatic conditions of Russia and Germany has been determined. The protein content in the grain after inoculation was higher than in the control, without reducing the yield. The researches about inoculation strategy in temperate regions is insufficient due to the limited acreage of soybeans. The researches about inoculation strategy in temperate climate regions is insufficient due to the limited Research on inoculation strategy in temperate regions is insufficient due to the limited sown area of soybeans. In the course of many years of research (2015-2019) of the genetic resources of soybeans at the biological station "Lake Kuchak" of Tyumen State University (Tyumen region, Nizhnetavdinsky district), it was found that for soybean plants need specific nodules. bacteria of nitrogen fixation (BNF). In cases where there are no bacteria in the soil, it is necessary to process the seeds with selected strains of *Bradyrhizobium japonicum*. In our researches, we used strains 626a and

634b from the All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology (St. Petersburg). On the day of sowing, seeds of four storage periods (2, 3, 4, 5 years) of the SibNIK 315 variety were kept in an aqueous suspension of bacteria (exposure for 2 hours at a dilution of 0.005 g of the drug per 10 ml of water) or in distilled water (control).

During the formation of soy beans in variants with bacterial strains, on the roots were found nodule bacteria (not less than 4.5 ± 0.3 pcs. on 1 plant, or maximum - 19.0 ± 0.8 pcs.). In the control, nodules were not formed on the roots, which indicates the absence of *Bradyrhizobium* in the sod-podzolic soil of the experimental plot. The change in chlorophyll content in leaves cells at different stages of phenological development was used as an indicator of BNF and was determined using Minolta SPAD-502. In the variants of the experiment at the time of counting the nodules, the chlorophyll index was 40.9 ± 1.43 (strain 626a) and 46.1 ± 1.28 (strain 634b) units. spad (in the control, the chlorophyll index of 35.1 ± 1.31 spad units was significantly lower). After inoculation, 23.2-54.1% more beans were formed on the plants than in the control. The maximum seed yield reached 408 ± 19.7 g / m² (strain 626a) and 460 ± 18.8 g/m² (strain 634b), the excess over the control was 22.0% and 30.9%, respectively.

Considering the increasing demand for genetically unmodified soybeans in the future, we pay great attention to the ecological study of varieties [2]. Based on the results of comprehensive assessments and multiple selections, a promising breeding material was identified that is maximally adapted to contrasting soil and climatic factors. The growing season of varieties resistant to cold stress can be significantly reduced due to the early sowing period (first decade of May). Analysis of the variability of traits of cultivars in different geographic ranges under the influence of meteorological factors makes it possible to correctly use the genetic diversity of plants and develop a strategy for their adaptation to climatic changes.

Referemces

1. Kühling I., Hüsing B., Bome N., Trautz D. (2018) Soybeans in high latitudes: effects of *Bradyrhizobium* inoculation in Northwest Germany and southern West Siberia. *Organic Agriculture* 8 (2): 159-171. doi:10.1007/s13165-017-0181-y.
2. Bome N.A., Galchinskaya T.I. Cultivation of soybeans in the south of the Tyumen region / Leguminous crops - a developing direction in Russia. *The First International Forum, July 19-22, 2016 Omsk, 2016. S. 28-31*

УДК 330.3 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-338-339

КОРРЕКТИРОВКА ПОНЯТИЙНОГО АППАРАТА В ОБЛАСТИ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ПРОДУКТ-ОРИЕНТИРОВАННОГО ЗАКОНОДАТЕЛЬСТВА

Брускин С.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
 Российской академии наук, Москва, Россия
 119991, ГСП-1, Москва, ул.Губкина, д.3
 e-mail: brouskin@vigg.ru

Рассмотрены вопросы правового регулирования ГМО в России. Показано, что для перехода к инновационному развитию необходима корректировка понятийного аппарата и развитие продукт-ориентированного законодательства.

Ключевые слова: ГМО, трансгенные организмы, цисгенные организмы, правовое регулирование ГМО

Основополагающие принципы правового регулирования в области генной инженерии в Российской Федерации, в том числе понятийный аппарат, определены Федеральным законом от 05.07.1996 N 86-ФЗ. Данный закон определяет генно-инженерно-модифицированный организм как «организм или несколько организмов, любое неклеточное, одноклеточное или многоклеточное образование, способные к воспроизводству или передаче наследственного генетического материала, отличные от природных организмов, полученные с применением методов генной инженерии и содержащие генно-инженерный материал, в том числе гены, их фрагменты или комбинации генов». При этом в настоящее время российское законодательство разрешает использовать ГМО в производстве медицинских препаратов, кормов для животных и продуктов питания (за некоторым исключением), а разведение и выращивание ГМО животных и растений прямо запрещает. В результате этого запрета в России наблюдается существенное технологическое отставание в области получения новых линий и сортов растений с помощью методов генной инженерии. Это привело, к примеру, к тому, что Россия не может включиться в гонку получения новых линий и сортов растений с помощью технологий редактирования генома, в то время как в США такие растения скоро выйдут на рынок.

Поэтому, для устойчивого экономического развития нашей страны и внедрения достижений генетической науки в практику, необходимо реформировать российское законодательство, которое бы, прежде всего, ориентировалось на характеристики полученного продукта, а не на способы его получения. При этом крайне важно, чтобы понятийный аппарат законодательства не противоречил биологическим определениям. Возможно, идеальным вариантом было бы отказаться от термина «ГМО» как итоговой характеристики продукта, т.к. при современном развитии генной инженерии такой термин означает только совокупность методов, с помощью которых была изменена генетическая информация, но никак не отражает характера этих изменений. Введение в законодательство таких понятий, как: «трансгенный организм» (данное понятие существует в российском законодательстве, однако противоречит биологическому смыслу термина), «цисгенный организм», «интрагенный организм», «организм с направленным изменением генома без внесения в него чужеродной ДНК» и «организм с искусственным/синтетическим геном/геномом» - позволит не использовать термин «ГМО» как конечную характеристику продукта, а также четкое разделение организмов по таким группам позволит разработать правовое регулирование выращивания и использования организмов исходя из определённых изменений в их геноме, т.е. основываясь на характеристике полученного продукта, а не на способы его получения.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 18-29-14067).

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-338-339

ADJUSTMENT OF THE CONCEPTED APPARATUS IN THE FIELD OF GENE ENGINEERING FOR THE FORMATION OF PRODUCT-ORIENTED LEGISLATION

Bruskin S.A.

*Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119991, GSP-1, Moscow, Gubkina st., Bld.3
e-mail: brouskin@vigg.ru*

The issues of legal regulation of GMOs in Russia are reviewed. It is shown that for transformation to innovative development, it is necessary to correct the conceptual framework and develop product-oriented legislation.

Key words: GMOs, transgenic organisms, cisgenic organisms, legal regulation of GMOs

The fundamental principles of legal regulation of genetic engineering in the Russian Federation, including the conceptual framework, are determined by the Federal Law of 05.07.1996 N 86-FZ. This law defines genetically modified organism as "an organism or several organisms, any non-cellular, unicellular or a multicellular formation capable of reproducing or transmitting hereditary genetic material, differ from other natural organisms, developed by genetic engineering methods and contained genetically engineered material, including genes, their fragments or combinations of genes." Currently in Russia it is permitted by Russian legislation to use GMOs for production medicines, animal feed and food (with some exceptions), but at the same time the breeding and cultivation of GMO animals and plants is strictly prohibited. As a result of such contradictions, in Russia there is a significant technological gap in the field of developing of new lines and varieties of plants by genetic engineering methods. As a result, for example, it is impossible for Russia to be a real competitor within development new lines and varieties of plants by genome editing technologies, while in the United States such types of plants would soon be available on the market. Therefore, for the sustainable economic development of our country and implementing achievements of genetic science into production, it is necessary to change Russian legislation, which would be primarily focused on the characteristics of the final product, but not on the methods of its development. At the same time, it is extremely important that the conceptual framework of the legislation does not contradict to biological definitions. Perhaps it would be ideally to refuse to use the term "GMO" as a final characteristic of product, because of now for modern genetic engineering it means only just a set of methods by which the genetic information was changed, but it does not reflect types of any changes. The introduction into the legislation of the terms as "transgenic organism" (it currently exists in Russian legislation, but contradicts to biological explanation of the term), "cisgenic organism", "intra-genic organism", "an organism with a directed change in the genome without introducing foreign DNA into it" and "an organism with artificial / synthetic genome / genome" will allow not to use the term GMO as a final characteristic, while a clear determination of organisms into these groups will allow to develop legal regulation of the cultivation and use of organisms according to particular changes in their genome, based on the characteristics of the final product, but not on the methods of development it.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant No. 18-29-14067) .

UDC 633.111:606 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-340-341

ВЫЯВЛЕНИЕ РЕАКЦИИ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ НА СПОСОБЫ И НОРМЫ ОБРАБОТКИ БИОПРЕПАРАТАМИ

Горьков А.А.^{1,2}, Павловская Н.Е.¹, Гагарина И.Н.¹, Горькова И.В.¹

¹ ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет им. Н.В. Парахина», г. Орел, Россия
302019, г. Орел, ул. Генерала Родина, 69
e-mail: aleksey555.zbk@gmail.com

² ФГБНУ «Федеральный научный центр зернобобовых и крупяных культур» г. Орёл, Россия

Изучено влияние способов обработки биологическими препаратами семян и посевов озимой пшеницы на особенности роста, развития, накопление криопротекторов и качество урожая.

Ключевые слова: озимая пшеница, биопрепараты, всхожесть, урожайность, адаптация, стресс, зимостойкость.

Разработка технологических принципов применения биопрепаратов на озимых культурах с целью улучшения физиолого-биохимического состояния и регулирования клеточного метаболизма и газообмена листьев является актуальным. Авторами разработаны эффективные дозы микроэлементов и биологически активных веществ в составе биопрепаратов (биофлавоноиды гречихи, лектины сои) для озимой пшеницы, приводящих к усилению биосинтеза сахарозы и ферментов, катализирующих реакции, связанные с процессами дыхания, гликолиза. В процессе гликолиза часть свободной энергии превращается в АТФ, которая и играет роль в реакциях окислительного стресса у растений. Биопрепараты выступают как индукторы адаптации к холоду. Обработка семян озимой пшеницы перед посевом повышает энергию прорастания на 15%, всхожесть на 10-16%, густоту растений озимой пшеницы на 1 м² в среднем на 10%, дополнительная обработка всходов увеличивает содержание сахаров в узлах кущения, улучшая возможности растений к перезимовке. Биопрепараты оказывают существенное влияние на формирование элементов структуры урожая. Так, озерненность колоса по вариантам опыта увеличилась в среднем на 7,71%, продуктивность колоса на 11 %, масса 1000 зерен на 3,3%. Наибольшая урожайность зерна озимой пшеницы получена у сорта Леонида с применением нового биопрепарата - 8,67 т/га, максимальная прибавка урожая составила у твердого сорта Кристелла - 0,87 т/га или 33% при применении биопрепаратов на основе лектинов и биофлавоноидов. Биопрепараты значительно улучшают качественные характеристики зерна озимой пшеницы, увеличивая содержание клейковины от 5 до 22%, изменяют показания ИДК на 11 – 18 единиц. Расчеты экономической эффективности показали, что применение биопрепаратов в технологии возделывания озимой пшеницы экономически выгодно, при этом наивысшая прибыль была получена с сорта Кристелла при использовании биопрепарата, содержащего биофлавоноиды гречихи (9326,8 руб/га).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-316-90021.

UDC 633.111: 606 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-340-341

DETERMINATION OF THE REACTION OF WINTER WHEAT ON METHODS AND RATES OF PROCESSING BY BIOLOGICAL PRODUCTS

Gorkov A.A.^{1,2}, Pavlovskaya N.E.¹, Gagarina I.N.¹, Gorkova I.V.¹

¹ Federal State Budgetary Educational Establishment of Higher Education "Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhin", Orel, Russia
302019, Orel, st. General Rodina, 69
e-mail: aleksey555.zbk@gmail.com

² Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Scientific Center of Legumes and Groat Crops", Orel, Russia

The influence of biological treatment methods of seeds and crops of winter wheat on the characteristics of growth, development, accumulation of cryoprotectants and crop quality is studied.

Key words: winter wheat, biological products, germination, yield, adaptation, stress, winter hardiness.

The development of technological principles for the use of biological products in winter crops in order to

improve the physiological and biochemical state and regulate cellular metabolism and leaf gas exchange is relevant. The authors have developed effective doses of trace elements and biologically active substances in biologics (buckwheat bioflavonoids, soy lectins) for winter wheat, leading to an increase in the biosynthesis of sucrose and enzymes that catalyze reactions associated with respiration and glycolysis. In the process of glycolysis, part of the free energy is converted into ATP, which plays a role in oxidative stress reactions in plants. Dental products act as inducers of adaptation to cold. Processing of winter wheat seeds before sowing increases germination energy by 15%, germination by 10-16%, plant density of winter wheat plants by 1 m² on average by 10%, additional seedling treatment increases the sugar content in tillering nodes, improving the ability of plants to overwinter. Biological products have a significant impact on the formation of crop structure elements. Thus, spike grains according to the experimental variants increased on average by 7.71%, spike productivity by 11%, weight of 1000 grains by 3.3%. The highest yield of winter wheat grain was obtained from the Leonid cultivar using a new biological product - 8.67 t / ha, the maximum yield increase for the hard Kristella variety - 0.87 t / ha or 33% when using biological products based on lectins and bioflavonoids. Biological products significantly improve the quality characteristics of winter wheat grains, increasing the gluten content from 5 to 22%, and changing the IDK readings by 11 - 18 units. Calculations of economic efficiency showed that the use of biological products in the technology of cultivating winter wheat is economically profitable, while the highest profit was obtained from the Kristella variety using a biological product containing buckwheat bioflavonoids (9326.8 rub / ha)

The reported study was funded by RFBR, project number 19-316-90021.

УДК 633.111:606 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-341-343

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ВЫРАЩИВАНИЯ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ КРИОАДАПТЕРОВ

Горьков А.А.^{1,2}, Павловская Н.Е.¹

¹ ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет им. Н.В. Парахина», г. Орел, Россия
302019, г. Орел, ул. Генерала Родина, 69
e-mail: aleksey555.zbk@gmail.com

² ФГБНУ «Федеральный научный центр зернобобовых и крупяных культур» г. Орёл, Россия

Получены биологические препараты, усиливающие ростовую активность растений, индуцирующие морозоустойчивость, вызывая повышенный синтез криопротекторов. Рекомендуется обрабатывать семена биопрепаратами в количестве 500 мл/т, а опрыскивать растения 250 мл/га.

Ключевые слова: озимая пшеница, биологические средства защиты, криоадаптеры, морозоустойчивость.

Современные технологические принципы применения криоадаптеров (КАП) на озимых культурах применяют с целью улучшения физиолого-биохимического состояния и регулирования клеточного метаболизма и газообмена листьев. Лучшее понимание процесса холодной акклиматизации под влиянием КАП, идентификация компонентов, играющих роль в этом процессе, предоставляют новые возможности для генетического улучшения и управления важными составляющими будущего урожая важнейшей зерновой и продовольственной культуры. Возможность снижения повреждающего воздействия замораживания на показатели метаболизма, приводящие к потере урожая можно осуществить с помощью применения новых биологических адаптеров, созданных на основе элиситоров, выделенных из растительных клеток. Такими элиситорами могут выступать лектины и биофлаваноиды, на основе которых создаются новые средства регуляции роста и развития растений. Эти природные компоненты выступают как конститутивные, так и индуцибельные факторы стрессо- и болезнеустойчивости. (патенты № 2372753 от 20.11.2009 г: №2463759 от 20.10.2012 г).

Обработка семян озимой пшеницы КАП оказывает положительное влияние на морозоустойчивость и холодостойкость растений, и способствуют более интенсивному накоплению криозащитных соединений (например, углеводов, аминокислот и пролина).

Установлено, что КАП повышают густоту растений озимой пшеницы на 1 м² в среднем на 10%, полевую всхожесть на 10-16%. Обработка посевов приводит к повышению содержания сахаров у неустойчивых сортов в 3 раза. У устойчивых сортов до 10%. Обнаружена положительная динамика общей активности антиоксидантной системы, увеличение содержания пролина в проростках пшеницы под влиянием новых препаратов. При анализе активности дегидрогеназ было выявлено возрастание активности ферментов при применении КАП с действующим веществом лектины. Обработка КАП с действующим веществом

флавоноидов гречихи во всех исследуемых образцах приводит к снижению активности ферментов на 2-3%. При холодовом закаливании активность дегидрогеназ увеличивается к 3 суткам на 25%, а затем падает. Показано также, что повышение значения данного показателя характеризует эти сорта как менее устойчивые к перезимовке.

Обработка семян биопрепаратами в процессе холодового закаливания позволяет поддерживать активность дегидрогеназ на одном и том же уровне, что обеспечивает снижение генерации АФК дыхательной цепью.

Анализ данных позволил составить протокол отбора адаптеров морозоустойчивости озимой пшеницы по относительному изменению активности дегидрогеназ. Так было показано, что при величине относительного изменения активности дегидрогеназ $\leq 15\%$ в течение первых 3-х суток при холодовом закаливании и постоянной величине с 3 по 7 сутки разработанные композиции можно передавать на следующий этап апробации, что существенно сокращает время диагностики препарата.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-316-90021.

UDC 633.111: 606 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-341-343

MODERN TECHNOLOGIES OF GROWING WINTER WHEAT WITH APPLICATION OF CRYOADAPTERS

Gorkov A.A.^{1,2}, **Pavlovskaya N.E.**¹

¹ Federal State Budgetary Educational Establishment of Higher Education "Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhin", Orel, Russia

302019, Orel, st. General Rodina, 69

e-mail: aleksey555.zbk@gmail.com

² Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Scientific Center of Legumes and Groat Crops", Orel, Russia

Biological preparations were obtained that enhance the growth activity of plants, induce frost resistance, causing increased synthesis of cryoprotectants. It is recommended to treat the seeds with biological products in an amount of 500 ml / t, and spray the plants with 250 ml / ha.

Key words: winter wheat, biological protective equipment, cryoadapters, frost resistance.

Modern technological principles for the use of cryoadapters (CAP) in winter crops are used to improve the physiological and biochemical state and regulate cellular metabolism and leaf gas exchange. A better understanding of the cold acclimatization process under the influence of CAP, identification of the components that play a role in this process, provide new opportunities for genetic improvement and management of important components of the future harvest of the most important grain and food crops. The ability to reduce the damaging effects of freezing on metabolic rates leading to yield loss can be achieved by using new biological adapters based on elicitors isolated from plant cells. Lectins and bioflavonoids can act as such elicitors, on the basis of which new means of regulating plant growth and development are created. These natural components are both constitutive and inducible factors of stress and disease resistance. (patents No. 2372753 dated November 20, 2009; No. 2463759 dated October 20, 2012).

CAP winter wheat seed treatment has a positive effect on frost resistance and cold resistance of plants, and contribute to a more intensive accumulation of cryoprotective compounds (for example, carbohydrates, amino acids and proline).

It was found that KAP increase the density of winter wheat plants by 1 m² on average by 10%, field germination by 10-16%. Processing crops leads to an increase in sugar content in unstable varieties by 3 times. In resistant varieties up to 10%. Positive dynamics of the overall activity of the antioxidant system and an increase in the proline content in wheat seedlings under the influence of new drugs were found. When analyzing the activity of dehydrogenases, an increase in the activity of enzymes was revealed when using CAP with the active substance of lectins. Treatment of CAP with the active ingredient of buckwheat flavonoids in all the studied samples leads to a decrease in enzyme activity by 2-3%. With cold hardening, the activity of dehydrogenases increases by 3 days by 25%, and then decreases. It was also shown that an increase in the value of this indicator characterizes these varieties as less resistant to overwinter.

The treatment of seeds with biological products in the process of cold hardening allows maintaining the activity of dehydrogenases at the same level, which reduces the generation of ROS by the respiratory chain.

An analysis of the data made it possible to draw up a protocol for the selection of winter wheat frost resistance adapters for the relative change in the dehydrogenase activity. So it was shown that with a relative change in the

activity of dehydrogenases of $\leq 15\%$ during the first 3 days during cold hardening and a constant value from 3 to 7 days, the developed compositions can be transferred to the next stage of testing, which significantly reduces the time of diagnosis of the drug.

The reported study was funded by RFBR, project number 19-316-90021.

УДК 58.085:57.083.1 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-343-344

СТЕРИЛИЗАЦИЯ СЕМЯН ИОНАМИ СЕРЕБРА И СЕРЕБРЯНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ, ПОЛУЧЕННЫМИ МЕТОДОМ «ЗЕЛеноЙ ХИМИИ»

Желтова А.А., Попова А.С., Зайцев В.Г.

Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук, Волгоград, Россия
400062, Волгоград, пр-т Университетский, д. 97
e-mail: zheltova-a@vifanc.ru

Для поверхностной стерилизации семян ячменя наиболее эффективен 0,14% AgNO_3 , обеспечивающий максимальную степень обеззараживания при сохранении высокой всхожести. Обработка семян ячменя H_2O_2 или серебряными наночастицами, полученными методом «зеленой химии» оказалась неэффективной.

Ключевые слова: поверхностная стерилизация, семена, ячмень, нитрат серебра, серебряные наночастицы.

Ключевым этапом, влияющим на качество культуры растений *in vitro*, является обеспечение стерильности эксплантов или семян при первичной инициации культуры. Важно при максимальной степени обеззараживания поверхности эксплантов и семян сохранить их высокую приживаемость и всхожесть. Ячмень считается традиционно трудно вводимым в культуру *in vitro*, поэтому необходим поиск более эффективных способов поверхностной стерилизации семян. В настоящей работе была изучена возможность использования растворов нитрата серебра и наночастиц серебра (AgNPs) для поверхностной стерилизации семян ячменя перед проращиванием *in vitro* на стерильной среде Мурашиге – Скуга. AgNPs синтезировали методом восстановления ионов серебра при 37°C экстрактами – чабреца, шалфея, эвкалипта и эхинацеи. Размер AgNPs, полученных с помощью растительных экстрактов, составил 58-77 нм (чабрец), 69-70 нм (шалфей), 56-65 нм (эвкалипт), 32-93 нм (эхинацея) по результатам измерений на DLS-анализаторе Photocor Compact-Z. Предварительная стерилизация семян включала последовательное промывание проточной водой (30 мин), мыльным раствором (10 мин), проточной водой (10 мин), 0,002% раствором KMnO_4 (10 мин) и ополаскивание стерильной водой. Основная стерилизация проводилась по схемам: 1) контрольный образец – 15 мин в стерильной H_2O ; 2) стандартный образец – 15 мин в 3% H_2O_2 , затем промывание стерильной водой в течение 5 мин; 3) опытный образец – 30 мин в неразведенной суспензии AgNPs, затем промывание стерильной H_2O (5 мин); 4) опытный образец – 15 или 30 мин в растворах AgNO_3 с концентрацией 1% (58,8 мМ); 0,14% (8,3 мМ) или 0,02% (1,25 мМ), затем промывание стерильной H_2O (5 мин); 5) согласно схемам 3 или 4 + 3% H_2O_2 (15 мин), далее промывка стерильной водой. Результаты оценивали на 5 день культивирования.

Сравнение показателей в группах проводили с помощью z-теста (<https://www.socscistatistics.com/tests/ztest/default2.aspx>).

Было показано, что стерилизация семян ячменя 3% H_2O_2 оказалась неэффективной, поскольку на 5 день культивирования все семена были поражены, как и при обработке водой. Обработка семян ячменя AgNPs, независимо от схемы, не обеспечивала получения стерильных проростков. Воздействие растворами AgNO_3 статистически значимо повышала эффективность стерилизации ($p < 0,001$ в сравнении с H_2O_2). Последующая обработка 3% H_2O_2 не влияла на выход стерильных семян. Поверхностная стерилизация 0,02% AgNO_3 относительно слабо эффективна (процент стерильности 40%, всхожесть 85%). Увеличение концентрации AgNO_3 до 1% приводит к увеличению стерильности семян практически до 100% – эффективность стерилизации в течение 30 мин сравнима с 15 мин ($p = 0,968$), но при этом снижается всхожесть семян (с 65% до 31,6%, $p = 0,037$). Наиболее оптимальна обработка семян 0,14% AgNO_3 в течение 30 минут, обеспечивающей при сравнимой с 1% AgNO_3 эффективности стерилизации (95%, $p = 0,322$) большее количество проросших семян (80% против 65%, $p = 0,002$). Таким образом, обработка 0,14% AgNO_3 обеспечивает эффективную стерилизацию семян ячменя при сохранении высокой всхожести.

UDC 58.085:57.083.1 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-343-344

SEED STERILIZATION USING SILVER IONS AND SILVER NANOPARTICLES SYNTHESIZED BY GREEN CHEMISTRY METHODS

Zheltova A.A., Popova A.S., Zaitsev V.G.

Federal Research Centre of Agroecology, Complex Melioration, and Forest Reclamations RAS
 400062, Volgograd, Universitetskij Prospekt, 97
 e-mail: zheltova-a@vfanc.ru

Most effective surface sterilization of barley seeds is treatment by 0,14% AgNO₃, producing maximal sterilization level coupled with high germination rate. Treatments of the seeds by H₂O₂ or silver nanoparticles synthesized by green chemistry methods were inefficient.

Key words: surface sterilization, seeds, barley, silver nitrate, silver nanoparticles.

Key stage that impacts quality of in vitro plant culture is achieving of explants or seeds for primary culture initiation. Maximal effectiveness of sterilization of explant or seed surface should be combined with high viability or germination rate. Barley is one of the difficult crops for in vitro plant culture and needs to find more effective surface sterilization protocols. In the current study use of silver nitrate solutions and silver nanoparticles (AgNPs) for barley seed surface sterilization before in vitro germination on Murashige-Skoog medium was tested. AgNPs were synthesized via silver ions reduction at 37°C by plant extracts produced from thyme, sage, eucalyptus or echinacea. Sizes of the AgNPs produced using plant extracts were 58-77 nm (thyme), 69-70 nm (sage), 56-65 nm (eucalyptus), 32-93 nm (echinacea) according to measurements by DLS analyzer Photocor Compact-Z. Presterilization included sequential washing by running water (30 min), soap solution (10 min), running water (10 min), 0,002% KMnO₄ solution (10 min) and rinse with sterile water. Sterilization was performed by following protocols: 1) blank protocol – 15 min with sterile H₂O; 2) reference protocol – 15 min with 3% H₂O₂ with following rinse with sterile water during 5 min; 3) tested protocol – 30 min with undiluted AgNPs suspension with following rinse with sterile water (5 min); 4) tested protocol – 15 or 30 min with AgNO₃ solutions with different concentrations: 1% (58,8 mM); 0,14% (8,3 mM) and 0,02% (1,25 mM), with following rinse with sterile water (5 min); 5) according to protocols 3 or 4 with additional treatment by 3% H₂O₂ (15 min) and following rinse with sterile water. Outcomes were recorded after 5 days of cultivation. Differences between outcomes of various protocols were tested by z-test (<https://www.socscistatistics.com/tests/ztest/default2.aspx>).

We showed barley seed sterilization by 3% H₂O₂ was inefficient as all seeds were contaminated after 5 days of cultivation as like as after water treatment. Barley seed treatment by any AgNPs independently from kind of protocol didn't provide sterile seedling formation. Seed treatment by AgNO₃ solutions significantly enhanced sterilization effectiveness ($p < 0,001$ in comparison with H₂O₂ treatment). Subsequent treatment by 3% H₂O₂ didn't influence on the uncontaminated seed outcome. Surface sterilization by 0,02% AgNO₃ was weakly effective (sterilization effectiveness 40%, germination rate 85%). Increase of AgNO₃ concentration up to 1% improved seed sterilization effectiveness up to about 100%; 30-minute treatment produced decontamination rates similar to results of 15-minute treatments ($p = 0,968$) but declined germination rate (from 65% to 31,6%, $p = 0,037$). Optimal treatment of barley seeds was by 0,14% AgNO₃ during 30 min that provided similar sterilization effectiveness in comparison with the treatment by 1% AgNO₃ (95%, $p = 0,322$) but increased number of germinating seed (80% vs 65%, $p = 0,002$). Therefore, the treatment by 0,14% AgNO₃ produced effective sterilization of barley seeds coupled with high germination rate.

УДК 577.112.083 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-344-346

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТНОГО АНАЛОГА Lc-LTP2 ЧЕЧЕВИЦЫ

Корупаева Е.Ю., Финкина Е.И., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В.

Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия, 117997, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
 e-mail: l.korupaeva@inbox.ru

Разработан биотехнологический способ получения и очистки мутантного аналога липид-транспортирующего белка чечевицы Lc-LTP2 с заменой остатка тирозина в положении 80 на аланин (Y80A).

Ключевые слова: липид-транспортующий белок, связывание лигандов, мутантный аналог, биотехнологическое получение, рекомбинантный белок, чечевица

Растительные липид-транспортующие белки (LTP) составляют класс небольших катионных белков, в структуре которых присутствует внутренняя гидрофобная впадина. Данные белки способны связывать и переносить липидные молекулы между биомембранами *in vitro*. Они играют важную роль в растениях, участвуют в их росте, развитии, размножении и защите в условиях стресса. Механизмы связывания и транспорта гидрофобных лигандов растительными LTP мало изучены. Необходимым этапом в изучении молекулярного механизма связывания является исследование роли отдельных аминокислотных остатков LTP во взаимодействии с лигандами.

Липид-транспортующий белок Lc-LTP2 выделен из семян чечевицы обыкновенной *Lens culinaris*. Показано, что Lc-LTP2 связывает широкий спектр лигандов, но наибольшее сродство имеет к ненасыщенным жирным кислотам с длиной ацильной цепи C16 и C18 (олеиновой, линолевой), а также к анионным лизолипидам. В структуре Lc-LTP2 присутствует характерная гидрофобная впадина. В области «нижнего» входа во впадину находятся аминокислотные остатки Arg45, Pro79 и Tyr80. Нами было высказано предположение, что данные остатки Lc-LTP2 играют важную роль в связывании липидных лигандов.

Для того, чтобы проверить это предположение, был получен мутантный аналог Lc-LTP2 с заменой остатка тирозина в положении 80 на аланин (Y80A). Введение аминокислотной замены было проведено с помощью метода сайт-направленного мутагенеза с использованием в качестве матрицы ранее полученной плазмидной ДНК pET-His8-TrxL-Lc-LTP2. Наличие введенной мутации было подтверждено методами ПЦР и секвенирования. Для получения штамма-продуцента компетентные клетки *E. coli* BL-21(DE3) трансформировали плазмидой pET-His8-TrxL-Lc-LTP2(Y80A). Экспрессию гибридного белка проводили при 30°C, используя в качестве индуктора 0,2 мМ IPTG, после чего клетки осаждали центрифугированием. Выделение гибридного белка His8-TrxL-Lc-LTP2(Y80A) проводили из осветленного клеточного лизата, используя металлохелатную хроматографию на колонке с Ni²⁺-сефарозой. Элюированный градиентом имидазола гибридный белок диализовали и лиофильно высушивали. Расщепление His8-TrxL-Lc-LTP2(Y80A) проводили бромцианом в кислой среде, после чего продукты реакции разделяли с помощью повторной аффинной хроматографии. Очистку целевого белка Y80A проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в линейном градиенте концентрации ацетонитрила в присутствии 0,1% ТФУ. Чистота полученного препарата была подтверждена методом SDS-электрофореза в ПААГ. Полученное методом MALDI-TOF масс-спектрометрии значение молекулярной массы рекомбинантного белка (9199,870 Да) соответствовало расчетной массе мутантного аналога Y80A (9199,61 Да). Вторичную структуру мутантного аналога исследовали с помощью КД-спектроскопии. КД-спектр мутантного аналога Y80A был схож с таковым у белка дикого типа и характеризовался высоким содержанием α -спиралей.

Таким образом, в результате проведенной работы получен мутантный аналог Lc-LTP2 чечевицы Y80A в количестве около 5 мг, достаточном для проведения дальнейших экспериментов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №19-74-00150).

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-344-346

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF A MUTANT ANALOG OF THE LENTIL LC-LTP2

Korupaeva E.Yu., Finkina E.I., Melnikova D.N., Ovchinnikova T.V.

M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya str., 16/10, Moscow 117997, Russia
e-mail: l.korupaeva@inbox.ru

A biotechnological method for obtaining a mutant analog of the lentil lipid transfer protein Lc-LTP2 with the tyrosine 80 replacement for alanine (Y80A) was developed.

Key words: lipid-transfer protein, ligand binding, mutant analog, biotechnological production, recombinant protein, lentil

Plant lipid transfer proteins (LTPs) are a class of small cationic proteins with an internal hydrophobic cavity in their structure. These proteins are capable to bind and transfer lipid molecules between biomembranes *in vitro*. They play an important role in plants, participate in their growth, development, reproduction, and protection under stress conditions. Mechanisms of binding and transfer of hydrophobic ligands by plant LTPs have not been sufficiently

studied. Investigation of the role of individual amino acid residues in LTP-ligand interactions is a necessary step in study of the molecular binding mechanism.

The lipid transfer protein Lc-LTP2 was isolated from the lentil *Lens culinaris* seeds. It was shown that Lc-LTP2 binds a wide range of ligands, but it has the highest affinity to unsaturated fatty acids with the acyl chain lengths C16 and C18 (oleic, linoleic), as well as to anionic lysolipids. A characteristic hydrophobic cavity is present in the Lc-LTP2 structure. The amino acid residues Arg45, Pro79, and Tyr80 are located near the bottom entrance of the cavity. We have therefore suggested that these residues play an important role in Lc-LTP2 binding of lipid ligands.

In order to confirm this assumption, we obtained a mutant analog of Lc-LTP2 with the replacement of tyrosine 80 for alanine (Y80A). The amino acid substitution was carried out using the site-directed mutagenesis and the previously obtained plasmid pET-His8-TrxL-Lc-LTP2 as a matrix. The presence of the introduced mutation was confirmed by PCR and DNA sequencing. To obtain a producing strain, competent *E. coli* BL-21 (DE3) cells were transformed with the plasmid pET-His8-TrxL-Lc-LTP2(Y80A). The expression of the fusion protein was induced at 30°C using 0.2 mM IPTG, then the cells were precipitated by centrifugation. Isolation of His8-TrxL-Lc-LTP2(Y80A) from clarified cell lysate was performed by metal chelate chromatography using a Ni²⁺-sepharose column. The fusion protein eluted with an imidazole gradient was dialyzed and freeze-dried. Cleavage of His8-TrxL-Lc-LTP2(Y80A) was performed with cyanogen bromide under acidic conditions, and the obtained products were separated by repeated affinity chromatography. Purification of the target protein Y80A was performed by reverse-phase HPLC in a linear gradient of acetonitrile concentration in the presence of 0.1% TFA. The purity of the recombinant protein was confirmed by SDS-PAGE. The molecular mass of the recombinant protein (9199.870 Da) measured by MALDI-TOF mass spectrometry corresponded to the calculated mass of the mutant analog Y80A (9199.61 Da). The secondary structure of the mutant analog was investigated using CD spectroscopy. The CD spectrum of the mutant analog Y80A was similar to that of the wild-type protein and was characterized by a high content of α -helices.

Thus, as a result of the work, the mutant analog Y80A of the lentil Lc-LTP2 was obtained in an amount of about 5 mg, sufficient for further experiments.

The work was supported by the Russian Science Foundation (grant № 19-74-00150).

УДК 604.6; 601.4; 602.6 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-346-349

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ ТАБАКА С РЕДАКТИРОВАННЫМ ГЕНОММ: ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ВЫКЛЮЧЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНА ФИТОЕН- ДЕСАТУРАЗЫ НА РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЯ

Нежданова А. В., Камионская А. М., Слугина М. А., Кочиева Е. З., Эльдаров М. А., Щенникова А. В.

Институт Биотехнологии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
 Российской академии наук, Москва, Россия
 117312, Москва, пр-т 60-летия Октября, д. 7, корп. 1
 e-mail: anna-negdanova@mail.ru

Получены растения табака с редактированным геномом. Частично выключен синтез фитоеен-десатуразы – одного из основных ферментов каротиноидного пути. Отредактированные линии характеризуются мозаичной альбиносностью, замедленным ростом и значительным сокращением численности соцветия.

Ключевые слова: геномное редактирование; CRISPR/Cas9; *Nicotiana tabacum*; фитоеен-десатураза PDS; биосинтез каротиноидов.

Один из современных способов выявления функции генов растений – направленное редактирование генома с помощью системы CRISPR/Cas9, использование которой приводит к нокауту или введению желаемой мутации в ген-мишень [1]. Солнечный свет активирует широкий спектр генов растений, связанных как с фотосинтезом, так и с фотоморфогенезом, включая гены биосинтеза каротиноидов [2]. Каротиноиды действуют как антенные пигменты для поглощения и преобразования световой энергии [3], но также защищают хлоропласты от ее излишков [4]. Фитоеен-десатураза (PDS) – один из ключевых ферментов каротеногенеза, повышенная активность которого ассоциирована с уменьшением повреждений хлорофилла [5]. Отсутствие экспрессии гена *PDS* ведёт к накоплению фитоеена и альбиносности листьев *Nicotiana benthamiana* [6]. Суперэкспрессия *PDS*, напротив, способствует росту содержания β -каротина [7]. Основной целью настоящего исследования стала оценка эффективности применения метода CRISPR/Cas9 к видам Паслёновых, многие представители которых являются важнейшими сельскохозяйственными

культурами. Для этого мы использовали вид *Nicotiana tabacum* как представителя *Solanaceae* и одновременно модельного растения, и ген *NtPDS* в качестве мишени для редактирования и визуально регистрируемого маркера события редактирования. С помощью программ CRISPRdirect [8] и CRISPR MultiTargeter [9] была проанализирована последовательность *NtPDS* и определен консервативный участок экзона III (GAGATTGTTATTGCTGGTGCAGG), пригодный в качестве гидовой ПНК и использованный для создания конструкции на основе rYLCRISPR/Cas9P35S-N [10]. Полученная конструкция была использована для агробактериальной трансформации листовых эксплантов табака с последующей селекцией регенерантов на среде, содержащей канамицин (100 мг/л), а также по наличию фенотипических проявлений выключения PDS. Большинство регенерантов оказалось нежизнеспособным. Всего было получено 14 трансгенных линий с подтвержденным наличием кассеты экспрессии гена *NPTII* и ярко выраженной карликовостью, замедленным развитием и значительно сниженной численностью соцветия. Листья 30% растений содержали белые, не пигментированные участки. Из листьев трансгенных растений и нетрансгенного контроля была выделена геномная ДНК, которую использовали для амплификации целевого участка гена *NtPDS*. ПЦР-фрагменты были клонированы в вектор pGEM-Teasy и секвенированы (по 10 клонов в каждом случае). Структурный анализ целевых участков в 7 из 14 линий подтвердил факт редактирования выбранного участка гена (присутствие однонуклеотидных делеций/вставок, приводящих к сдвигу рамки считывания). Полученные результаты показали достаточную эффективность применения системы CRISPR/Cas9 для нокаута генов-мишеней у табака. При этом наличие большого процента нежизнеспособных регенерантов свидетельствует о том, что эффективность системы может быть ещё выше. Таким образом, мы полагаем, что данная система может быть успешно использована для редактирования генов развития, ассоциированных с ценными агрономическими признаками, при этом не только у табака, но и у других видов Паслёновых. Данное исследование поддержано РФФИ (грант № 18-29-07007) и Министерством науки и высшего образования РФ.

Литература

1. Arora L., Narula A. Gene editing and crop improvement using CRISPR/Cas9 system//Front Plant Sci. 2017. Vol. 8. Article 1932.
2. Pizarro L., Stange C. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants//Cien. Inv. Agr. 2009. Vol. 36. P. 143–162.
3. Krause G. H. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms//Physiol. Plantarum. 1988. Vol. 74. P. 566–574.
4. Li J., Li J., Guo S. R., Kang Y. Y., Masayuki F. Effects of light intensity on photosynthetic pigments of spinach//J. Shanghai Jiaotong Univ. 2008. Vol. 26. P. 386–389.
5. Huang J. C., Liu J., Li Y. T., Chen F. Isolation and characterization of the phytoene desaturase gene as a potential selective marker for genetic engineering of the astaxanthin-producing green alga *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta)//J. Phycol. 2008. Vol. 44. P. 684–690.
6. Kumagai M. H., Donson J., Della-Cioppa G., Harvey D., Grill K. H. K. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with viral-derived RNA//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92. P. 1679–1683.
7. Romer S., Fraser P. D., Kiano J. W., Shipton C. A., Misawa N., Schuch W., Bramley P. M. Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants//Nat. Biotechnol. 2000. Vol. 18. P. 666–669.
8. Naito Y., Hino K., Bono H., Ui-Tei K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites//Bioinformatics. 2015. Vol. 31. № 7. P. 1120–1123.
9. Prykhozhiy S. V., Rajan V., Gaston D., Berman J. N. CRISPR multitargeter: a web tool to find common and unique CRISPR single guide RNA targets in a set of similar sequences//PLoS One. 2015. Vol. 10. № 3. Article e0119372.
10. Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Wang B., Yang Z., Li H., Lin Y., Xie Y., Shen R., Chen S., Wang Z., Chen Y., Guo J., Chen L., Zhao X., Dong Z., Liu Y. G. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants//Mol. Plant. 2015. Vol. 8. № 8. P. 1274–1284.

GENERATION OF TOBACCO PLANTS WITH EDITED GENOME: EVALUATION OF THE INFLUENCE OF CANCELLED ACTIVITY OF THE PHYTOENE DESATURASE GENE ON PLANT DEVELOPMENT

Nezhdanova A. V., Kamionskaya A. M., Slugina M. A., Kochieva E. Z., Eldarov M. A., Shchennikova A. V.

Institute of Bioengineering, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

117312, Moscow, pr-t 60-letiya Oktyabrya, 7, korp. 1

e-mail: anna-negdanova@mail.ru

Tobacco plants with the edited genome were generated. The synthesis of phytoene desaturase, one of the main enzymes of the carotenoid pathway, is partially impaired. Edited lines are characterized by mosaic albino phenotype, delayed growth, and significant reduction in the flower number in inflorescence.

Key words: genome editing; CRISPR/Cas9; *Nicotiana tabacum*; phytoene desaturase PDS; carotenoid biosynthesis.

One of the modern ways to determine the function of plant genes is the directed genome editing by the CRISPR/Cas9 system, the use of which leads to knockout or the introduction of the desired mutation in the target gene [1]. Sunlight activates a wide range of plant genes associated with both photosynthesis and photo morphogenesis, including genes for carotenoid biosynthesis [2]. Carotenoids act as antenna pigments for the absorption and conversion of light energy [3], but also protect chloroplasts from light excess [4]. Phytoene desaturase (PDS) is one of the key enzymes of carotenogenesis, the increased activity of which is associated with a decrease in chlorophyll damage [5]. The lack of the PDS gene expression leads to the accumulation of phytoene and leaf albinosity in *Nicotiana benthamiana* [6]. Overexpression of PDS, in contrast, promotes an increase in the content of b-carotene [7]. The main objective of this study was to evaluate the effectiveness of applying the CRISPR/Cas9 method to Solanaceae species, many of which are the most important agricultural crops. For this, we used the species *Nicotiana tabacum* as a representative of Solanaceae and at the same time a model plant, and the *NtPDS* gene as a target for editing and a visually recorded marker of the editing event. Using the CRISPRdirect [8] and CRISPR MultiTargeter [9] programs, we analyzed the *NtPDS* sequence and determined the conserved region in exon III (GAGATTGTTATTGCTGGTGCAGG), suitable as a guide RNA and used to generate a construct based on pYLCRISPR/Cas9P35S-N [10]. The resulting design was used for agrobacterial transformation of tobacco leaf explants with subsequent selection of regenerants on the kanamycin containing medium (100 mg/l), as well as for the presence of PDS knockout phenotype. Most regenerants turned out to be unviable. A total of 14 transgenic lines were obtained with the confirmed presence of the *NPTII* gene expression cassette and pronounced dwarfism, delayed development, and significantly reduced flower number in inflorescences. The leaves of 30% of the plants contained white, unpigmented areas. Genomic DNA was isolated from the leaves of transgenic plants and non-transgenic control, and used to amplify the target region of the *NtPDS* gene. PCR fragments were cloned into the pGEM-Teasy vector and sequenced (10 clones in each case). In 7 of 14 lines, structural analysis of the target region confirmed the fact of editing the selected gene region (the presence of single nucleotide deletions/inserts, leading to a shift in the reading frame). The results showed that CRISPR/Cas9 system is sufficiently effective for knocking out target genes in tobacco. Moreover, the presence of a large percentage of non-viable regenerants indicates that the effectiveness of the system can be even higher. Thus, we suggest that this system can be successfully used to edit developmental genes associated with valuable agronomic traits, not only in tobacco, but also in other Solanaceae species. The study was supported by the RFBR #18-29-07007 and Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

References

1. Arora L., Narula A. Gene editing and crop improvement using CRISPR/Cas9 system//*Front Plant Sci.* 2017. Vol. 8. Article 1932.
2. Pizarro L., Stange C. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants//*Cien. Inv. Agr.* 2009. Vol. 36. P. 143–162.
3. Krause G. H. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms//*Physiol. Plantarum.* 1988. Vol. 74. P. 566–574.
4. Li J., Li J., Guo S. R., Kang Y. Y., Masayuki F. Effects of light intensity on photosynthetic pigments of spinach//*J. Shanghai Jiaotong Univ.* 2008. Vol. 26. P. 386–389.

5. Huang J. C., Liu J., Li Y. T., Chen F. Isolation and characterization of the phytoene desaturase gene as a potential selective marker for genetic engineering of the astaxanthin-producing green alga *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta)//*J. Phycol.* 2008. Vol. 44. P. 684–690.
6. Kumagai M. H., Donson J., Della-Cioppa G., Harvey D., Grill K. H. K. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with viral-derived RNA//*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92. P. 1679–1683.
7. Romer S., Fraser P. D., Kiano J. W., Shipton C. A., Misawa N., Schuch W., Bramley P. M. Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants//*Nat. Biotechnol.* 2000. Vol. 18. P. 666–669.
8. Naito Y., Hino K., Bono H., Ui-Tei K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites//*Bioinformatics.* 2015. Vol. 31. № 7. P. 1120–1123.
9. Prykhozhiy S. V., Rajan V., Gaston D., Berman J. N. CRISPR multitargeter: a web tool to find common and unique CRISPR single guide RNA targets in a set of similar sequences//*PLoS One.* 2015. Vol. 10. № 3. Article e0119372.
10. Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Wang B., Yang Z., Li H., Lin Y., Xie Y., Shen R., Chen S., Wang Z., Chen Y., Guo J., Chen L., Zhao X., Dong Z., Liu Y. G. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants//*Mol. Plant.* 2015. Vol. 8. № 8. P. 1274–1284

УДК 615.664.54 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-349-350

ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ X-, Y-, S-, M-ВИРУСОВ И ВИРУСА СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ

Семейкина А.А., Алиев В.О., Костенко С.Н., Серёгина П.К., Шпакова Н.А.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский проспект, 33
e-mail: anastasiyasemejkina@gmail.com

Разработаны и апробированы иммунохроматографические тест-системы для определения: X-, Y-, S-, M-вирусов и вируса скручивания листьев картофеля. Показано достижение предела обнаружения 10 нг/мл, регламентируемого ГОСТ 33996-2016, путем подбора мембраны для нанесения конъюгата, а также оптимизации параметров конъюгата маркер-антитела и состава буферных рабочих растворов.

Ключевые слова: вирусы картофеля, иммунохроматография, тест-полоски, реакция антиген-антитело, оптимизация аналитических систем.

Вирусные заболевания картофеля могут приводить к снижению урожая на 80%. Наиболее эффективное средство борьбы с ними – своевременная диагностика посадочного материала. Для контроля патогенов картофеля используются различные высокочувствительные методы анализа, такие как ИФА и ПЦР. Однако они не лишены недостатков, ограничивающих их применение: трудоемкость, необходимость дорогостоящего оборудования и привлечения высококвалифицированного персонала. Использование неинструментальных методов, таких как иммунохроматографический анализ (ИХА), упрощает процедуру диагностики, сокращает время анализа и повышает экономическую эффективность процесса.

Цель работы создание ИХА тест-систем для выявления пяти наиболее вредоносных вирусных патогенов картофеля: X-, Y-, S-, M-вирусов и вируса скручивания листьев картофеля.

Специфические антитела к вирусам картофеля получены в отделе биотехнологии и иммунодиагностики Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха.

Для достижения необходимых аналитических характеристик проведен ряд оптимизаций.

Выбраны окрашенные частицы (коллоидное золото) со средним диаметром 15 нм и узким распределением по размерам. Их использование обеспечило максимальную интенсивность окрашивания контрольной и аналитической зон.

Варьировали оптическую плотность конъюгата наночастицы золота – антитела и количество иммобилизованных антител. Оптимальные результаты были достигнуты при $D^{520}=8$ (расход антител составляет 10 мкг на 1 мл коллоидной суспензии). Проведено сравнение мембран для нанесения конъюгата (компаний MDI и Ahlstrom-Munksjö) по скорости и равномерности движения фронта жидкости, а также по степени вымывания пробы и специфических реагентов. Мембрана MDI R7 определена как лучшая.

Подобраны детергенты в составе рабочих буферных растворов, минимизирующие фоновое окрашивание мембраны при тестировании растительных экстрактов.

Тест-полоски были апробированы совместно с ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха в экстрактах растительных проб – листьев и клубней картофеля. Показан предел обнаружения вирусов менее

10 нг/мл, что соответствует требованиям ГОСТ 33996-2016. Время анализа составляет 15 минут, чувствительность и специфичность диагностики – 99%.

Разработанные тест-системы могут быть успешно использованы для отбора базовых клонов в Российском банке здоровых сортов картофеля, контроля качества и мониторинга вирусологического состояния семенного картофеля.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-349-350

TEST SYSTEMS FOR RAPID DETECTION OF X-, Y-, S-, M- VIRUSES AND POTATO LEAF ROLL VIRUS

Semeikina A.A., Aliev V.O., Kostenko S.N., Seryogina P.K., Shpakova N.A.

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

Immunochromatographic test systems to determine X-, Y-, S-, M - virus and virus of potato leaf roll were developed and tested. It was shown that the detection limit of 10 ng/ml, regulated by state standard 33996-2016, was achieved by selecting the conjugate pad, as well as optimizing the parameters of the marker-antibody conjugate and the composition of buffer working solutions.

Key words: potato viruses, lateral flow immunoassay, test-system, antigen-antibody reaction, optimization of LFIA test-systems.

Potato viral diseases can reduce potato yields up to 80%. The most effective means of dealing with them is timely diagnostics for planting material. To control viruses various highly sensitive methods of analysis are used, such as ELISA and PCR. However, these assay techniques have some disadvantages limiting their using: time-consuming, require expensive equipment and highly qualified staff. Using non-instrumental methods, such as lateral flow immunoassay (LFIA), simplifies diagnostic procedures, reduces analysis time and increases the cost-effectiveness of the process.

The aim of our work was to develop LFIA test-systems for detecting of the five most harmful viral pathogens of potato: X-, Y-, S-, M-viruses and potato leaf roll virus.

Specific antibodies to viruses were produced in the department of biotechnology and immunodiagnosics of the Russian Potato Research Institute. To achieve the necessary analytical characteristics, we carried out a number of optimizations. Colored particles (colloidal gold) with an average size of 15 nm and a narrow size distribution provided the highest intensity of staining of the control and analytical zones. We varied the optical density of the conjugate and the concentration of immobilized antibodies; optimal results were achieved at an optical density of 8 (antibody consumption of 10 µg per ml of colloidal suspension). We compared the conjugate and sample pads (MDI and Ahlstrom-Munksjö) in terms of speed and uniformity of the liquid front movement, as well as the degree of the samples and specific reagents washing out. The MDI R7 membrane was chosen as the best. Salts and detergents varied in the composition of working buffer solutions. This allowed us to remove background staining of the membrane when testing plant extracts.

The resulting test-strips were tested with the support of the Russian Potato Research Institute on purified viruses suspended on plant extracts (leaves and tubers of potatoes) . The detection limit was less than 10 ng/ml, which meets the requirements of state standard 33996-2016. The analysis duration was 15 min, the specificity and sensitivity were about 99%.

The developed test-systems can be successfully used for selection of base clones in the Russian Bank of healthy potato varieties, quality control and monitoring of the virological state of seed plantations.

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ СРЕДСТВА АЛКОПЕРИТ НА ОБЪЕКТАХ РАСТЕНИЕВОДСТВА

Заболоцкая Т.В., Штауфен А.В., Волков М.Ю., Девришов Д.А., Блохин Ю.И.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии-МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23
e-mail: zabolockaya@bk.ru

Работа посвящена изучению эффективности аэрозольной дезинфекции средством «Алкоперит» помещений для выращивания сельскохозяйственных культур и его безопасности для растений.

Ключевые слова: Алкоперит, дезинфицирующие средства, аэрозольный способ дезинфекции

Большинство дезинфицирующих препаратов, применяемых на различных объектах сельского хозяйства не могут быть использованы при выращивании, транспортировке и хранении продуктов растениеводства вследствие активного накопления в растительной продукции дезинфицирующих компонентов. Это значительно снижает список дезинфектантов для борьбы с микроорганизмами в этой отрасли. Компоненты, входящие в состав дезинфицирующих средств для указанных целей не должны быть токсичными для человека и животных, а также абсолютно биodeградируемыми.

Целью наших исследований являлось изучение дезинфицирующей активности препарата Алкоперит при аэрозольной дезинфекции фитотрона - камеры позволяющей выращивать растения в условиях, имитирующих тепличные и обеспечивающей заданные оптимальные режимы. Высокая влажность, оптимальная температура зачастую приводит к активному размножению микроорганизмов, вызывающих болезни растений и последующую порчу продукции. Изучение безопасности аэрозоля средства Алкоперит для растений проводили на культуре салата листового.

Таблица. Дезинфицирующая активность препарата Алкоперит при аэрозольной дезинфекции фитотрона

| Объект исследования | | КОЕ | |
|---------------------------------|---------------------------------|--------------|-----------------|
| | | До обработки | После обработки |
| Поверхности/ см ² | Свободный фитотрон | 121 | - |
| | Фитотрон в процессе культивации | 216 | 3 |
| | Листья растений | 18 | 2 |
| Воздушная среда /м ³ | Свободный фитотрон | 2400 | - |
| | Фитотрон в процессе культивации | 3733 | 266 |

В ходе проведенных исследований была выявлена высокая противомикробная активность аэрозоля средства Алкоперит. Так, в результате проведенной дезинфекции свободного фитотрона наблюдалась полная деконтаминация поверхностей и воздушной среды камеры. При дезинфекции фитотрона в процессе выращивания культуры салата листового наблюдалось значительное снижение общей микробной обсемененности поверхностей (в 72 раза), а контаминация воздушной среды снизилась в 14 раз. На поверхности листьев также наблюдалось значительное снижение содержания микроорганизмов – в 9 раз. При этом дезинфектант в применяемых режимах оказался абсолютно безвредным для культуры растения: не отмечено поражений тканей листа (химических ожогов), замедления развития растений.

Таким образом, в ходе проведенных исследований была выявлена высокая противомикробная активность аэрозоля дезинфицирующего средства Алкоперит при использовании в процессе выращивания растительной продукции и его безопасности средства для салата листового.

Литература

1. Белова, В.И. Основные направления исследований по разработке дезинфицирующих средств / В.И. Белова, Ю.П. Волков // Научные основы дезинфекции и стерилизации. Сборник научных трудов.- М. 1991.- С. 13-18.

2. Волков, Ю.П. Перспективы развития исследований в области разработки дезинфицирующих средств / Ю.П. Волков // Материалы научной конференции "Актуальные проблемы дезинфекции, стерилизации, дезинсекции и дератизации". М.; 1992. - С. 13-14.
3. Осипова, В. Л. Дезинфекция / В.Л. Осипова. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011.
4. Тепличный практикум. Физиология растений и биохимия: дайджест журнала «Мир теплиц» / ЗАО «Тепличный сервис»; сост. А.Д. Цыдендамбаев. - М.: Мир теплиц, 2015. - 292 с.

UDC: 619:616.56 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-351-353

STUDY OF THE ACTIVITY OF ALCOPERIT DRUG ON PLANT GROWING OBJECTS

Zabolotskaya T.V., Shtaufen A.V., Volkov M.Y., Devrishov D.A., Blokhin Y.I.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin»,
109472, Moscow, Academician Skryabin St, 23

The work is devoted to study of the effectiveness of aerosol disinfection with «Alcoperit» drug for growing crops and its safety for plants.

Key words: Alcoperit, disinfectants, aerosol disinfection method

Most disinfectants used at various agriculture facilities cannot be used in the cultivation, transportation and storage of agriculture products due to the active accumulation of disinfectant components in the plant products. This significantly reduces the list of microbial disinfectants in this industry. The components, included in the composition of disinfectants for these purposes should not be toxic to humans and animals and must be absolutely biodegradable.

The aim of our research was to study the disinfectant activity of the drug Alcoperit at aerosol disinfection of phytotron – a camera that allows growing plants in conditions, simulating greenhouse and providing preset optimal modes. High humidity and temperature often leads to the active reproduction of microorganisms that cause plant diseases and subsequently spoilage of products. The study of the safety of Alcoperit aerosol for plants was carried out on a leaf lettuce culture.

Table. Disinfectant activity of Alcoperite during aerosol disinfection of phytotron

| Object of study | | CFU | |
|---------------------------------|---|-------------------|------------------|
| | | Before processing | After processing |
| The surface/ cm ² | Free phytotron | 121 | - |
| | Phytotron in the process of cultivation | 216 | 3 |
| | Plant leaves | 18 | 2 |
| Air environment /m ³ | Free phytotron | 2400 | - |
| | Phytotron in the process of cultivation | 3733 | 266 |

In the course of research, a high antimicrobial activity of the aerosol of Alcoperit was revealed. So, as a result of the disinfection of a free phytotron, complete decontamination of the surfaces and air of the camera was observed. During disinfection of the phytotron in the cultivation process of leaf lettuce culture, a significant decrease in the total microbial contamination of the surfaces was observed (72 times), and the air contamination decreased by 14 times. On the surface of the leaves, a significant decrease in the content of microorganisms was also observed – by 9 times. At the same time, the disinfectant in applicable modes used turned out to be absolutely harmless to the plant culture: no damage to leaf tissue (chemical burns) or slowing down the development of plants was noted.

Thus, in the course of research, a high antimicrobial activity of the Alcoperit disinfectant aerosol was revealed when used in the process of growing plant products and its safety for leaf lettuce.

References

1. Belova, V.I. The main areas of research on the development of disinfectants / V.I. Belova, Y.P.Volkov // Scientific basis of disinfection and sterilization. Collection of scientific papers.- M. 1991.- p. 13-18.

2. Volkov, Y.P. Prospects for the development of research in the development of disinfectants / Y.P. Volkov // Materials of the scientific conference "Actual problems of disinfection, sterilization, disinsection and disinfestation". M.; 1992. - p. 13-14.
3. Osipova, V. L. Disinfection / V.L. Osipova. - M.: GEOTAR-Media, 2011.
4. Greenhouse workshop. Plant Physiology and Biochemistry: Digest of the World of Greenhouses Magazine/CJSC «Greenhouse Service»; compiled by A.D. Tsidendambaev. - M.: Mir Teplits, 2015. - 292 p.

УДК 631.811 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-353-354

КОМПЛЕКСНЫЙ БИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ АУКСИНОВ.

Девришов Д.А., Волков М.Ю., Блохин Ю.И., Заболоцкая Т.В., Штауфен А.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина»
109472, г.Москва, ул.академика Скрябина, 23
e-mail: t_zabolockaya@mail.ru

Получен новый биологический препарат на основе автолизатов бактерий с добавлением минерала глауко-нит. Изучены его физико-химические свойства и биологическая активность.

Ключевые слова: глауксин, фитоминерал, автолизаты бактерий, антиоксидантная активность, биотестирование.

Цель работы: получение биологического стимулирующего препарата на основе автолизатов бактерий, исследование его физико-химических свойств и биологической активности.

Одним из путей решения задач, направленных на повышение урожайности растений, снижения их заболеваемости и, одновременно, очистке почв, является разработка эффективных и безопасных биологических стимуляторов роста растений. Именно препараты биологического происхождения, в призм все нарастающих современных экологических проблем рассматриваются как наиболее предпочтительные в использовании, в то время как препараты на основе химических комплексов, зачастую приводят к кумуляции в тканях растений, загрязнению окружающей среды токсикантами, и как следствие нарушения экологического благополучия. Известно, что микроорганизмы представителями родов *Bacillus* и *Pseudomonas* чаще всего встречаются в ризосфере и ризоплане растений и образуют с ними взаимовыгодные ассоциации, способные оказывать комплексное положительное воздействие на общее состояние растительного организма.

Основу биологического препарата «Глауксин» составляют автолизаты бактерий *Pseudomonas aureofaciens* и *Bacillus megaterium* обогащенные α -аланином, α -глутаминовой кислотой, 3-индолилуксусной кислотой, протеазой и гидролитическими ферментами, фолиевой кислотой и другими биологически активными веществами, способствующими росту растений и защите их от болезней.

В настоящей работе изучено влияние препарата «Глауксин» на наращивание зеленой массы растениями на примере салата листового, интенсивность накопления витаминов группы В и С, возможность накопления токсичных элементов (ртуть и кадмий), а также проведено биотестирование токсичности на моделях *Paramecium caudatum*.

Литература

1. Кефели Е.И. Проблема регуляторов роста и устойчивости, ее возможности и перспективы/Регуляторы роста и развития растений. - Киев: Наукова думка, 1999. - С. 325.
2. Терещенко Н.Н. Биодобрения на основе микроорганизмов / Томск: изд-во Томского гос.ун-та, 2003. - 60 с.
3. Synthesis of iron-amino acid chelates and evaluation of their efficacy as iron source and growth stimulator for tomato in nutrient solution culture / S.Ghasemi, A.H. Khoshgoftarmanesh, H. Hadadzadeh, M. Jafari // J. Plant Growth Regul. - 2012. - 31 (4). - P. 498-508.

UDK 631.811 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-353-354

COMPLEX BIOLOGICAL DRUG BASED ON BIOLOGICAL AUXINS.

Devrishov D.A., Volkov M. Y., Blokhin Y. I., Zabolockaya T.V., Shtaufen A.V.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology - MVA named after K.I. Skryabin", 109472, Moscow, Academician Skryabin St., 23
 e-mail: t.zabolockaya@mail.ru

A new biological preparation based on bacterial autolysates with the addition of the mineral glauconite has been obtained and studied its physical and chemical properties and biological activity .

Key words: glauxin, phytomineral, bacterial autolysates, antioxidant activity, bioassay.

Objective: to obtain a biological stimulant based on bacterial autolysates, study of its physicochemical properties and biological activity.

One of the ways to solution problems aimed at increasing plant productivity, reducing their incidence and, at the same time, cleaning the soil, is to develop effective and safe biological plant growth stimulants.

Exactly the drugs of biological origin, in the prism of all the growing contemporary environmental problems that are considered the most preferable to use, while drugs based on chemical complexes often lead to cumulation in plant tissues, environmental pollution by toxicants, and as a result of a violation of ecological well-being. It is known that microorganisms of the genera Bacillus and Pseudomonas are most often found in the rhizosphere and rhizoplan of plants and form mutually beneficial associations with them, which can have a comprehensive positive effect on the general condition of the plant organism.

The basis of the biological preparation "Glauksin" is autolysates of the bacteria Pseudomonas aureofaciens and Bacillus megaterium enriched with α -alanine, α -glutamic acid, 3-indolylacetic acid, protease and hydrolytic enzymes, folic acid and other biologically active substances that promotes plant growth and protecting them from disease.

In this work, we studied the effect of the Glauksin preparation on plant green mass growth using leaf lettuce, the accumulation rate of B and C vitamins, the possibility of accumulation of toxic elements (mercury and cadmium), and toxicity bioassay on Paramecium caudatum models.

References

1. Kefeli E.I. The problem of growth and stability regulators, its capabilities and prospects / Plant growth and development regulators. - Kiev: Naukova Dumka, 1999. -- S. 325.
2. Tereshchenko N.N. Biofertilizers based on microorganisms / Tomsk: publishing house of Tomsk State University, 2003. - 60 p.
3. Synthesis of iron-amino acid chelates and evaluation of their efficacy as iron source and growth stimulator for tomato in nutrient solution culture / S.Ghasemi, A.H. Khoshgoftarmanesh, H. Hadadzadeh, M. Jafari // J. Plant Growth Regul. – 2012. – 31 (4). – P. 498-508.

УДК: 635.5 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-354-356

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА ГЛАУКСИН НА БИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ

Заболоцкая Т.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии-МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23, e-mail: zabolotskaya68@bk.ru

Работа посвящена изучению накопления компонентов препарата Глауксин в тканях растений и его опосредованного влияния на биологические тест-модели. Метод биотестирования с использованием тест-культур Paramecium caudatum и Daphnia magna.

Ключевые слова: Глауксин, биотестирование

Биотестирование проводили с использованием тест-культур Daphnia magna и Paramecium caudatum.

Культуры выращивали на стандартных питательных средах с добавлением 50% измельченного салата листового, обработанного препаратом Глауксин, для контроля аналогично готовили питательную среду с добавлением необработанного салата. Культивирование проводили в плоскодонных 96-ти луночных планшетах в течение 10 дней, общий объем среды составлял 100 мкл. В каждую лунку вносили по 10 клеток, контроль активности тест-организмов проводили ежедневно, при этом регистрировали активность, характер движения и количество особей. Подсчёт проводили визуально при микрофотографировании с увеличением $\times 40$.

Таблица. Активность инфузорий в питательной среде с добавлением листьев салата

| Тест-культура | | Количество особей (среднее) | |
|---------------------|----------|-----------------------------|-------------|
| | | начало опыта | конец опыта |
| Daphnia magna | опыт | 10 | 10,8 |
| | контроль | 10 | 10,4 |
| Paramecium caudatum | опыт | 10 | 11 |
| | контроль | 10 | 11,7 |

По результатам биотестирования, препарат «Глауксин» не вызывает деактивации тест-культур *Daphnia magna* и *Paramecium caudatum* по сравнению с контролем, что дает основание предполагать, что выращенная продукция имеет достаточно высокий уровень пищевой безвредности и пищевой ценности.

Литература

1. Богдан А.С. Популяция одноклеточных организмов как модель интегральной оценки воздействия вредных факторов / А.С. Богдан // Тез. докл. Всесоюзной конф. – М., 1989. – С. 12-13.
2. Бурновский И.В. Основы экологии свободноживущих инфузорий: Автореф. дис. ... докт. биол. наук / И.В. Бурновский. – М., 1986. – 43 с.
3. Терещенко, Н.Н. Биодоброения на основе микроорганизмов / Н.Н. Терещенко. - Томск: Изд-во Томского гос. ун-та, 2003. - 60 с.
4. Филенко О.Ф. Область применения методов биотестирования / Филенко О.Ф. // Методы биотестирования качества водной среды. М., 1989. – 119 с.

UDC 635.5 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-354-356

DETERMINATION OF THE TOXICITY OF THE DRUG GLAUKSIN ON BIOLOGICAL MODELS

Zabolockaya T.V.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin»,
109472, Moscow, Academician Skryabin St, 23 e-mail: zabolotskaya68@bk.ru

The work is devoted to the study of the accumulation of the components of the drug Glauksin in the plant tissues and its indirect effect on biological test models. Biotesting method with using test cultures of *Paramecium caudatum* and *Daphnia magna*.

Key words: Glauksin, biotesting

Biotesting was performed with using test cultures *Daphnia magna* and *Paramecium caudatum*. Cultures were grown on standard nutrient media supplemented with 50% ground leaf slate treated with Glauksin drug; for control similarly prepared a nutrient medium with the addition of untreated salad. Cultivation was carried out in flat-bottomed 96-well plates for 10 days, the total volume of the medium was 100 mcl. In each well was added 10 cells, activity control of test organisms was carried out daily, while activity, the nature of movement and the number of individuals were recorded. The calculation was carried out visually by microscopy with a magnification of $\times 40$.

According to the results of the biotesting, the Glauksin preparation does not cause deactivation of the *Daphnia magna* and *Paramecium caudatum* test cultures as compared to the control, which suggests that the grown products have a fairly high level of food safety and nutritional value.

Table. The activity of ciliates in a nutrient medium with the addition of lettuce

| Test culture | | Number of individuals (average) | |
|---------------------|------------|---------------------------------|-------------------|
| | | Start of experience | End of experience |
| Daphnia magna | experiment | 10 | 10,8 |
| | control | 10 | 10,4 |
| Paramecium caudatum | experiment | 10 | 11 |
| | control | 10 | 11,7 |

References

1. Bogdan A.S. Population of unicellular organisms as a model for the integrated assessment of the impact of harmful factors / A.S. Bogdan // *Thes.rep.All-Union conf.* – М., 1989. – P. 12-13.
2. Burnovskii I.V. Basics of ecology of free-living ciliates: Diss.abstract ... Doctor of Biological Sciences / I.V. Burnovskii. – М., 1986. – 43 p.
3. Tereshenko, N.N. Microbial biofertilizers / N.N. Tereshenko. – Tomsk: Tomsk State University Publishing House 2003. - 60 p.
4. Filenko O.P. Area of application of biotesting methods / Filenko O.P.// *Water quality biotesting methods.* М., 1989. – 119 p.

УДК 608.3.: 316.422.42 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-356-358

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ПО ОБЕСПЕЧЕНИЮ СИСТЕМЫ ПРЕВЕНТИВНЫХ МЕР ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ БИОГЕННЫХ УГРОЗ ДЛЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР

Яковлева И.В., Камионская А.М.

Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
 Российской академии наук, Москва, Россия
 Москва 119071 Ленинский проспект, дом 33, строение 2
 e-mail: iacgea@biengi.ac.ru

Разработаны предложения по формированию качественно нового подхода по обеспечению превентивных мер предотвращения биогенных угроз – «безопасное проектирование», Показано, что повышение уровня безопасности может быть достигнуто за счет приоритета методологического подхода ex-ante над ex-post и изменения методов и инструментария исполнения.

Ключевые слова: биогенные угрозы, превентивные меры, растительные культуры

Актуальность и значимость мер обеспечения предотвращения биогенных угроз усиливается в последние декады, что обусловлено как внедрением в практическое использование сконструированных новых организмов - результатов постгеномных биотехнологий, так и пандемий природного характера. Возможность осуществления превентивных действий является принципиально важным, но сложным моментом, так как трудно предсказать характеристики не наступившего потенциального воздействия. Кроме того, на сегодня не сформировано еще понимание сходства и различия старых и новых рисков, присущих уже привычным и новым биотехнологическим продуктам, и способам их коммерциализации (выпуска).

Существенное место в развитии этого направления занимают вопросы безопасности организмов, созданных с помощью генетических технологий, и получаемой с их использованием продукции, особенно пищевой. Разработка современных эффективных методических основ оценки безопасности такой продукции для человека является приоритетом в мире и должна являться таковой и для России [Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 г. и дальнейшую перспективу (утв. Президентом РФ 1 ноября 2013 г. № Пр-2573)].

Нами разрабатывается система превентивных мер предотвращения биогенных угроз на основе их приоритета по сравнению с ликвидацией последствий угроз. Приоритет методологического подхода к формированию безопасности ex-ante над ex-post принципиально меняет методы оценки и критерии, и инструментарий исполнения.

Нами разработан качественно новый подход по обеспечению превентивных мер предотвращения биогенных угроз, называемый «безопасное проектирование», под которым имеется ввиду процесс, определяемый как интеграция методов идентификации и оценки рисков на ранних этапах процесса проектирования растительной культуры.

Для разработки системы превентивных мер нами предлагается ряд мер:

- проектирование новых организмов, исключая уже известные генетические элементы, несущие риски (например, гены кодирующих синтез токсинов или гены устойчивости к антибиотикам, последовательности, вызывающие аллергию и т.д.)
- идентификации потенциальных биогенных угроз в период планирования создания нового организма. Реализация этого принципа возможна с использованием российских и международных баз данных и реестров как существующих (BIOTRAC, ISAAA), , так и вновь создаваемых.
- включения параметров / функций безопасности в стандарт по безопасности биотехнологической растительной культуры, разработка протоколов по сертификации безопасности.
- введение специальных таможенных кодов для ввоза молекулярно-генетических материалов для научных исследований. Эта база могла бы стать дополнительным информационным источником данных о векторных системах, используемых в работах, в случае возникновения непредвиденных проблем
- разработка и введение в образовательную программу по генетической инженерии специального курса по «безопасному проектированию» биотехнологических растительных культур.

Превентивность оценки рисков новых биологических растительных продуктов становится аналогичной оценке безопасности в авиационной или ядерной промышленности, превращается, таким образом, в «культуру безопасности» биотехнологии растений.

Исследования частично поддержаны грантом РФФИ, Россия (No. 18-29-14067\18).

UDK 608.3.: 316.422.42 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-356-358

DEVELOPMENT OF APPROACHES TO ENSURE A SYSTEM OF PREVENTIVE MEASURES FOR PREVENTING BIOGENIC THREATS FOR PLANT CROPS

I. V. Yakovleva, A. M. Kamionskaya

*Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
Moscow 119071 Leninsky Prospekt, 33, building 2
e-mail: iacgea@biengi.ac.ru*

Proposals have been developed for the creation of a qualitatively new approach to ensure preventive measures to prevent biogenic threats - "safe design". It is shown that an increase in the level of safety can be achieved due to the priority of the ex-ante methodological approach over the ex-post and changes in methods and tools of realization.

Key words: biogenic threats, preventive measures, plant crops

The relevance and significance of measures to ensure the prevention of biogenic threats has been increasing in recent decades, which is due to both the introduction into practical use of obtaining new organisms - the results of post-genomic biotechnologies, and natural pandemics. The ability to take preventive action is fundamentally important, but hard, since it is difficult to predict the characteristics of potential impact that has not occurred. In addition, an understanding of the similarities and differences between old and new risks inherent in already familiar and new biotechnological products and the ways of their commercialization (release) has not yet been formed.

An important place in the development of this direction is occupied by the safety issues of organisms created with the help of genetic technologies, and products obtained with their use, especially food. The development of modern effective methodological foundations for assessing the safety of such products for humans is a priority in the world and should be such for Russia as well [Fundamentals of state policy in the field of chemical and biological safety of the Russian Federation for the period up to 2025 and beyond (approved by the President of the Russian Federation 1 November 2013 No. Pr-2573)].

We are developing a system of preventive measures to prevent biogenic threats based on their priority over the elimination of the consequences of threats. The priority of the methodological approach to the formation of ex-ante safety over ex-post fundamentally changes the assessment methods and criteria and tools for realization.

We have developed a qualitatively new approach to providing preventive measures to prevent biogenic threats, called "safe design", which means a process defined as the integration of methods for identifying and assessing risks in the early stages of the crop design process.

To develop a system of preventive measures, we propose a number of measures:

- designing new organisms, excluding already known genetic elements that carry risks (for example, genes encoding synthesis of toxins or genes for antibiotic resistance, sequences that cause allergies, etc.);
- identification of potential biogenic threats during the planning period for the creation of a new organism. The

implementation of this principle is possible with the use of Russian and international databases and registers, both existing (BIOTRAC, ISAAA), and newly created ones;

- inclusion of safety parameters / functions in the safety standard for biotechnological crops, development of safety certification protocols;

- introduction of special customs codes for the import of molecular genetic materials for scientific research.

This database could become an additional information source of data on vector systems used in works in case of unforeseen problems;

- development and introduction into the educational program on genetic engineering of a special course on "safe design" of biotechnological crops.

The proactive risk assessment of new biological plant products is becoming analogous to the safety assessment in the aviation or nuclear industry, thus becoming a "safety culture" of plant biotechnology.

The work was partly supported by the grant RFBR 182914067\18.

УДК 579.852.11.24 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-358-360

ЦВЕТОВАЯ ФОТОСТИМУЛЯЦИЯ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*

Яценко Е.С., Затонская Л.В., Темерев С.В., Саламатин К.В., Петухов В.А., Лыков П.В., Евдокимов И.Ю., Соловьева В.В.

Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия
 656049, Барнаул, пр. Ленина, 61, e-mail: mlprx@mail.ru

Представлены результаты исследования влияния цветовой фотостимуляции на динамику численности *Bacillus subtilis* в процессе культивирования.

Ключевые слова: цветная фотостимуляция, светодиоды, штамм, культивирование, *Bacillus subtilis*.

В последние десятилетия фотодинамическое воздействие красного, синего, фиолетового излучения на бактерий активно используется в медицине, с целью подавления роста патогенных и условно патогенных микроорганизмов [1,2,3].

Традиционно для защиты растений от микозов используют химический метод, включающий как протравливание семян, так и обработку посевов фунгицидами. В последнее время для защиты посевов от болезней используют биопрепараты. Сейчас в мире для борьбы с возбудителями болезней растений применяют препараты, в состав которых входит около 20 видов грибов и бактерий [4].

Bacillus subtilis – бактерии, входящие в состав высокоэффективных фунгицидных препаратов, действующих на различные фито-патогены. Из всех представителей этого вида в сельском и личном подсобном хозяйствах используются штаммы *Bacillus subtilis* проявляют разностороннее действие на возбудителей заболевания. Технологии производства биопрепаратов стремительно совершенствуются. Одна из задач производителей – экономическая доступностью препаратов для широкого потребителя. Чаще всего для удешевления продукции оптимизируют питательные среды, технологически процесс, и.т.д. Один из способов увеличения численности бактерий *Bacillus subtilis* в процессе культивирования является воздействие физических факторов.

Целью настоящей работы явился анализ воздействия различных цветов на численность бактерий *Bacillus subtilis* в процессе культивирования. В качестве объекта исследования использовали штаммы: *Bacillus subtilis* В-12079, *Bacillus subtilis* В- 2896, *Bacillus subtilis* В- 2895, *Bacillus subtilis* В- 4828, *Bacillus subtilis* В- 1323, *Bacillus subtilis* В- 5449.

Из спор готовили суспензию: в колбу Эрленмейера объемом 50 мл, содержащую жидкую питательную среду, которую готовят при следующем соотношении компонентов (г/л): пептон ферментативный – 15, дрожжевой экстракт – 5, натрий хлористый – 5, сульфат аммония – 1, метиленовый синий –1, остальное – дистиллированная вода. Значение рН 7,0–7,2. Стерилизация при 1,1 атм. в течение 40 мин. Затем вносили 5 г спор. Микроорганизмы выращивали в колбах с жидкой средой в шейкер-инкубаторе «Иппова 44» при 250 об/мин (эксцентриситет 5 см) и температуре 37°С в течение 24 часов. На стенки инкубаторы были закреплены светодиоды, красного (624-650 нм), синего (440-465нм) и зеленого (510-550нм) цветов. Культивировании происходило при воздействии, красного, синего и зеленого цветов и были использованы комбинации цветов: синий и зеленый, красный и зеленый, красный и синий и комбинация из трех цветов. Стекло инкубатора было закрыто фольгой и не пропускало свет из помещения. Для выявления численности микроорганизмов использовали стандартный метод десятикратных разведений,

с высевом в стерильных условиях в чашки Петри на агаризованную питательную среду, выше указанного состава. После чего чашки с посевами инкубировали при температуре 37°C в течение 24 часов. В качестве контрольной пробы проводилось культивирование в колбе, закрытой фольгой, которая исключала попадание световой волны. Все опыты были проведены в семикратной повторности.

Было выявлено, что при культивировании с красным светом и с комбинацией красного и зелено численность бактерий достоверно не отличалась от контрольной пробы; при культивировании с синим светом, красным и синим и комбинации трех цветов численность была достоверно ниже, чем в контроле; при воздействии синим и зеленым численности увеличилась в среднем в полтора раза; воздействию зеленым численности увеличилась в два и более раз.

Таким образом, воздействие зеленым и комбинацией синего и зеленого света в процессе культивирования способствует увеличению численности бактерий *Bacillus subtilis*.

Литература

1. Е.С. Тучина, В.В. Тучин, Г.Б. Альшулер, И.В. Ярославский. Фотодинамическое воздействие красного (625 нм) и инфракрасного (805 нм) излучения на бактерии р. ACNES, обработанные фотосенсибилизаторами // Известия Саратовского университета. 2008. Т. 8. С. 21-26.
2. Е.С. Тучина, Н.М. Абаева, В.В. Тучин. Использование наночастиц TiO₂ при фотодинамическом воздействии светодиодного синего (405 нм) излучения на микроорганизмы // Известия Саратовского университета. 2010. Т. 10. С. 50-53.
3. В.З. Гертман, Е.С. Пушкарь, С.В. Понамаренко. Разработка параметров антибактериальной фотодинамической терапии с использованием света в оптическом диапазоне и фотосенсибилизатора метельного синего // Актуальные проблемы современной медицины: Вісник української медичної стоматологічної академії. 2017. Т. 17. Вып. 3. С. 9-12.
4. Л.П. Белов, В.А. Шкаликов, Ю.С. Дунаева. Возможности использования препарата на основе *Bacillus subtilis* и *Bacillus* в растениеводстве // АГРО, 2008, № 4–6, С.-59.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-358-360

COLOR PHOTOSIMULATION OF BACILLUS SUBTILIS BACTERIA

Yatsenko E.S., Zatonkaya L.V., Temerev S.V., Salamatina K.V., Petukhov V.A., Lykov P.V., Evdokimov I.Yu., Solovieva V.V.

Altai State University, Barnaul, Russia
656049, Barnaul, Lenin Ave., 61, e-mail: mlprx@mail.ru

The results of a study of the influence of color photostimulation on the dynamics of the number of *Bacillus subtilis* during cultivation are presented.

Key words: color photostimulation, LEDs, strain, cultivation, *Bacillus subtilis*.

In recent decades, the photodynamic effect of red, blue, and violet radiation on bacteria has been actively used in medicine in order to suppress the growth of pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms [1,2,3].

Traditionally, to protect plants from fungal infections, a chemical method is used, including both seed dressing and fungicide treatment of crops. Recently, biological preparations have been used to protect crops from diseases. Now in the world, to combat plant pathogens, drugs are used, which include about 20 species of fungi and bacteria [4].

Bacillus subtilis - bacteria that are part of highly effective fungicidal drugs that act on various phyto-pathogens. Of all the representatives of this species in agricultural and personal subsidiary plots, *Bacillus subtilis* strains are used that exhibit a versatile effect on the causative agents of the disease. Biological product manufacturing technologies are rapidly improving. One of the tasks of manufacturers is the economic affordability of drugs for the general consumer. Most often, in order to reduce the cost of production, they optimize nutrient media, a technological process, etc. One way to increase the number of *Bacillus subtilis* bacteria during cultivation is through exposure to physical factors.

The aim of this work was to analyze the effect of various colors on the number of *Bacillus subtilis* bacteria during cultivation. The following strains were used as an object of study: *Bacillus subtilis* B-12079, *Bacillus subtilis* B-2896, *Bacillus subtilis* B-2895, *Bacillus subtilis* B-4828, *Bacillus subtilis* B-1323, *Bacillus subtilis* B-5449.

A suspension was prepared from the spores: into a 50 ml Erlenmeyer flask containing a liquid nutrient medium, which was prepared in the following ratio of components (g / l): enzyme peptone - 15, yeast extract - 5, sodium chloride - 5, ammonium sulfate - 1, methylene blue - 1, the rest is distilled water. The pH value is 7.0–7.2. Sterilization at

1.1 atm. within 40 minutes Then 5 g of spores were added. Microorganisms were grown in flasks with liquid medium in an Innova 44 shaker incubator at 250 rpm (eccentricity 5 cm) and a temperature of 37 °C for 24 hours. LEDs of red (624-650 nm), blue (440-465 nm) and green (510-550 nm) colors were fixed on the walls of the incubators. Cultivation occurred when exposed to red, blue and green colors and combinations of colors were used: blue and green, red and green, red and blue and a combination of three colors. The glass of the incubator was covered with foil and did not transmit light from the room. To identify the number of microorganisms, the standard method of ten-fold dilutions was used, with inoculation under sterile conditions in Petri dishes on an agarized nutrient medium, above the indicated composition. Then the cups with crops were incubated at a temperature of 37 °C for 24 hours. As a control sample, cultivation was carried out in a flask closed with foil, which excluded the ingress of a light wave. All experiments were carried out in seven repetitions.

It was revealed that during cultivation with red light and with a combination of red and green, the number of bacteria did not significantly differ from the control sample; when cultured with blue light, red and blue and a combination of three colors, the number was significantly lower than in the control; when exposed to blue and green, the number increased on average one and a half times; exposure to green numbers increased two or more times.

Thus, exposure to green and a combination of blue and green light during cultivation increases the number of *Bacillus subtilis* bacteria.

References

1. E.S. Tuchina, V.V. Tuchin, G.B. Altshuler, I.V. Yaroslavsky Photodynamic effect of red (625 nm) and infrared (805 nm) radiation on the bacteria of the river. ACNES treated with photosensitizers // *News of Saratov University*. 2008. V. 8. P. 21-26.
2. E.S. Tuchina, N.M. Abaeva, V.V. Tuchin Use of TiO₂ nanoparticles under the photodynamic effect of LED blue (405 nm) radiation on microorganisms // *Izvestiya Saratov University*. 2010. V. 10. P. 50-53.
3. V.Z. Gertman, E.S. Pushkar, S.V. Ponamarenko. Development of parameters of antibacterial photodynamic therapy using optical light and a blue-green photosensitizer // *Actual problems of basic medicine: News of the Ukrainian Medical Dental Academy*. 2017. T.17. Vol. 3. S. 9-12.
4. L.P. Belov, V.A. Shkalikov, Yu.S. Dunaev. Possibilities of using the drug based on *Bacillus subtilis* and *Bacillus* in crop production // *AGRO*, 2008, No. 4-6, S.-59.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ПЕРЕРАБОТКЕ МИНЕРАЛЬНОГО СЫРЬЯ

BIOTECHNOLOGY IN PROCESSING OF MINERAL RAW MATERIALS

Руководители

Г.В. Седельникова д.т.н. профессор, зам. Директора ЦНИГРИ /

G.V. Sedelnikova professor, deputy director, Central Research Institute of Geological Exploration of Non-Ferrous and Noble Metals

А.Г. Булаев к.б.н., и.о. зав. лаборатории хемолитотрофных микроорганизмов, ФИЦ Биотехнологии РАН /

A.G. Bulaev PhD (Biology), acting head of Chemolithotrophic Microorganism Laboratory, Federal Research Center for Biotechnology of RAS

| | |
|---|-----|
| 1. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА НА БИООКИСЛЕНИЕ ПИРИТ-АРСЕНОПИРИТНОГО КОНЦЕНТРАТА Булаев А.Г., Нечаева А.В., Елкина Ю.А., Меламуд В.С..... | 361 |
| INFLUENCE OF TEMPERATURE AND CARBON SOURCE ON BIOXIDATION OF PYRITE-ARSENOPYRITE CONCENTRATE Bulaev A.G., Nechaeva A.V., Elkina Y.A., Melamud V.S..... | 362 |
| 2. МЕХАНИЗМ РАСТВОРЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ФОСФАТНЫХ РУД ПОД ДЕЙСТВИЕМ ШТАММА TRICHODERMA ASPERELLUM GJS 03-35 Жиглецова С. К., Дунайцев И.А., Кондрашенко Т.Н., Клыкова М.В., Коломбет Л.В. | 363 |
| MECHANISM OF VARIOUS ROCK PHOSPHATES DISSOLUTION BY TRICHODERMA ASPERELLUM GJS 03-35 Zhigletsova S.K., Dunaytsev I.A., Kondrashenko T.N., Klykova M.V., Kolombet L.V. | 364 |
| 3. МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ В МЕСТОРОЖДЕНИЯХ ТЯЖЕЛОЙ НЕФТИ КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЙ УВЕЛИЧЕНИЯ НЕФТЕИЗВЛЕЧЕНИЯ Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л., Семёнова Е.М., Груздев Д.С., Биджиева С.Х., Ершов А.П., Сердюков Д.В., Волков Д.С., Бугаев К.А., Хисаметдинов М.Р., Борзенков И.А., Назина Т.Н. | 365 |
| MICROBIAL DIVERSITY IN HEAVY OIL RESERVOIRS AS A BASIS FOR DEVELOPMENT OF BIOTECHNOLOGIES FOR ENHANCED OIL RECOVERY Sokolova D.S., Babich T.L., Semenova E.M., Grouzdev D.S., Bidzhieva S.K., Ershov A.P., Serdukov D.V., Volkov D.S., Bugaev K.A., Khisametdinov M.R., Borzenkov I.A., Nazina T.N..... | 366 |
| 4. ОБРАЗОВАНИЕ СУЛЬФИДОВ ЖЕЛЕЗА СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ ИЗ ГЕОТЕРМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМ Франк Ю.А., Анциферов Д.В., Лукина А.П., Иккерт О.П..... | 367 |
| FORMATION OF IRON SULFIDES BY SULPHATE-REDUCING BACTERIA FROM GEOTHERMAL ECOSYSTEMS Frank Y.A., Antsiferov D.V., Lukina A.P., Ikkert O.P..... | 368 |

УДК 62.99.29 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-361-363

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА НА БИООКИСЛЕНИЕ ПИРИТ-АРСЕНОПИРИТНОГО КОНЦЕНТРАТА

Булаев А.Г., Нечаева А.В., Елкина Ю.А., Меламуд В.С.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, 2
e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Было исследовано влияние температуры и источников углеродного питания на состав микробных сообществ, осуществляющих биоокисление золотосодержащего сульфидного концентрата, и на эффективность процесса биоокисления. Было показано, что использование дополнительных источников углерода позволяет влиять на активность процесса биоокисления и состав микробных популяций.

Ключевые слова: ацидофильные микроорганизмы, биогидрометаллургия, сульфидные концентраты.

Реакторное биоокисление, основанное на разрушении сульфидных минералов микроорганизмами, окисляющими двухвалентное железо и серу, успешно используется для переработки золотосодержащих концентратов в промышленном масштабе [1]. Понимание взаимосвязи между составом микробных популяций и эффективностью процессов биоокисления позволит разработать практические подходы, позволяющие управлять эффективностью процесса, поэтому во всем мире активно проводятся исследования микробных сообществ лабораторных и промышленных реакторов биоокисления [1, 2]. Целью работы было исследование микробных популяций, сформировавшихся в процессе биоокисления сульфидного пирит-арсенопиритного концентрата, содержащего золото, при разных условиях. Концентрат содержал 56% пирита, 14% арсенопирита, 34% сульфидной серы и 45 г/т золота. Биоокисление проводили в лабораторных реакторах в периодическом режиме при 40 и 50°C на протяжении 40 сут. Исследовали влияние источников углерода на эффективность процесса, добавляя в пульпу 0.02% мелассы или осуществляя подачу CO₂. Биоокисление при 40°C позволило без внесения дополнительных источников углерода окислить за 40 сут 27% пирита и 93% арсенопирита. Использование CO₂ позволило окислить 77% пирита и 98% арсенопирита, а внесение мелассы в питательную среду - 73% пирита и 98% арсенопирита. При 50°C использование дополнительных источников углеродного питания в большей степени повлияло на эффективность биоокисления. Без внесения дополнительных источников углерода биоокисление позволило за 40 сут окислить 9% пирита и 92% арсенопирита. Использование CO₂ позволило окислить 94% пирита и 99% арсенопирита, а внесение мелассы в питательную среду - 21% пирита и 94% арсенопирита. Анализ микробных популяций с помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов V3-V4 генов 16S рРНК показал, что использование CO₂ в качестве дополнительного источника углерода привело к увеличению доли в сообществах реакторов бактерий рода *Sulfobacillus* как при 40, так и при 50°C, что может свидетельствовать о их значительной роли в процессе биоокисления сульфидных минералов, прежде всего пирита.

Литература

1. Кондратьева Т.Ф., Булаев А.Г., Муравьев М.И. *Микроорганизмы в биогеотехнологиях переработки сульфидных руд*. – М.: Наука, 2015 год. – 212 с.
2. Smart M., Huddy R.J., Edward C.J., Fourie C., Shumba T., Iron J., Harrison S.T.L. *Linking Microbial Community Dynamics in BIOX® Leaching Tanks to Process Conditions: Integrating Lab and Commercial Experience // Solid State Phenomena*. – 2017. – V. 262. – P. 38–42.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-361-363

INFLUENCE OF TEMPERATURE AND CARBON SOURCE ON BIOXIDATION OF PYRITE-ARSENOPYRITE CONCENTRATE

Bulaev A.G., Nechaeva A.V., Elkina Y.A., Melamud V.S.

*Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Science; Moscow, Russia
119071, Moscow, Leninsky Ave, 33, bld. 2
e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru*

The effect of temperature and sources of carbon nutrition on the composition of microbial communities carrying out the biooxidation of gold-bearing sulfide concentrate and on the efficiency of the biooxidation was investigated. It was shown that the use of additional carbon sources makes it possible to influence the activity of the biooxidation process and the composition of microbial populations.

Key words: acidophilic microorganisms, biohydrometallurgy, sulfide concentrates

Tank biooxidation, based on the destruction of sulfide minerals by microorganisms oxidizing ferrous iron and sulfur, is successfully used for the processing of gold-bearing concentrates on an industrial scale [1]. Understanding the relationship between the composition of microbial populations and the efficiency of biooxidation processes will allow developing practical approaches to control the efficiency of the process, therefore, studies of microbial communities of laboratory and industrial scale biooxidation reactors are carried out worldwide [1, 2]. The goal of the present work was to study microbial populations formed in during biooxidation of sulfide gold-bearing pyrite-arsenopyrite concentrate under different conditions. The concentrate contained 56% pyrite, 14% arsenopyrite, 34%

sulfide sulfur and 45 g/t gold. Biooxidation was carried out in laboratory reactors in a batch mode at 40 and 50°C for 40 days. The effect of carbon sources on the process efficiency was investigated by adding 0.02% molasses to the pulp or by supplying CO₂. Biooxidation at 40°C for 40 days without adding additional carbon sources made it possible to oxidize 27% pyrite and 93% arsenopyrite. The use of CO₂ made it possible to oxidize 77% of pyrite and 98% of arsenopyrite, while addition of molasses into the nutrient medium allowed to oxidize 73% of pyrite and 98% of arsenopyrite. At 50°C, the use of additional carbon sources had a greater impact on the biooxidation efficiency. Without the additional carbon sources, biooxidation made it possible to oxidize 9% pyrite and 92% arsenopyrite for 40 days. The use of CO₂ made it possible to oxidize 94% of pyrite and 99% of arsenopyrite, while addition of molasses into the nutrient medium allowed to oxidize 21% of pyrite and 94% of arsenopyrite. Analysis of microbial populations using high-throughput sequencing of V3-V4 fragments of 16S rRNA genes showed that the use of CO₂ as an additional carbon source led to an increase in the proportion of bacteria of the genus *Sulfobacillus* in reactor communities at both 40 and 50°C, which may indicate their significant role in the process of biooxidation of sulfide minerals, primarily pyrite.

References

1. Kondrat'eva T.F., Bulaev A.G., Muravyov M.I. *Microorganisms in biotechnologies of sulfide ores processing*. — Moscow: Nauka, 2015. — 212 p.
2. Smart M., Huddy R.J., Edward C.J., Fourie C., Shumba T., Iron J., Harrison S.T.L. *Linking Microbial Community Dynamics in BIOX® Leaching Tanks to Process Conditions: Integrating Lab and Commercial Experience // Solid State Phenomena*. — 2017. — V. 262. — P. 38–42.

УДК 579.66 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-363-365

МЕХАНИЗМ РАСТВОРЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ФОСФАТНЫХ РУД ПОД ДЕЙСТВИЕМ ШТАММА *TRICHODERMA ASPERELLUM* GJS 03-35

Жиглецова С. К., Дунайцев И. А., Кондрашенко Т. Н., Клыкова М. В., Коломбет Л. В.

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Федеральной службы Роспотребнадзора, Россия
142279 Московская обл., Серпуховский г.о., п. Оболенск
e-mail: zhigletsova@obolensk.org

Процесс растворения минерального фосфорного сырья под действием *Trichoderma asperellum* имеет сложный механизм, обусловленный как участием органических кислот, так и другими факторами, основным из которых является выброс протонов при поглощении клетками иона аммония.

Ключевые слова: фосфатные руды; фосфатрастворяющие микроорганизмы; *Trichoderma asperellum*; биофосфорные удобрения.

Возможность использования микроорганизмов для разработки биофосфорных удобрений, в которых эффективное высвобождение фосфора из руд происходит непосредственно в полевых условиях и не наносит вреда окружающей среде, привлекает все больше внимание. Если микроорганизмы, растворяющие фосфатную руду, будут обладать и рядом других полезных свойств, например, стимулировать рост растений, подавлять фитопатогены и т.д., это позволит значительно повысить эффективность препаратов на их основе в повышении количества и качества сельскохозяйственной продукции.

В результате скрининга ранее был отобран штамм *T. asperellum* №16-GJS 03-35, антагонист многих возбудителей болезней растений, обладающий также ростстимулирующими свойствами. Впервые было показано наличие способности у грибов вида *T. asperellum* высвобождать фосфор из трикальций фосфата – модельного аналога минеральных фосфатных руд. Сочетание биологически и экономически важных свойств у отобранного гриба рода *Trichoderma* позволяет рассматривать его в качестве перспективного продуцента биопрепаратов комбинированного действия - пролонгированного биофосфорного удобрения с фунгицидными свойствами. Однако известно, что фосфатные руды могут различаться по доступности для одного микроорганизма более чем в 5 раз, и под влиянием руды может изменяться механизм высвобождения фосфатов. Поэтому целью настоящего исследования являлось изучение механизма высвобождения фосфора из различных типов фосфатных руд под воздействием штамма *T. asperellum* №16-GJS 03-35, необходимое для последующей разработки комбинированного биофосфорного удобрения на его основе.

Для изучения доступности фосфатных руд различного генезиса гриб культивировали в минимальной минеральной среде, где в качестве источника фосфора использовались фосфатные руды 9 отечественных и наиболее крупных зарубежных месторождений различного генезиса. Исследовались эндогенные и экзогенные апатиты, а также фосфориты - океанические, желваковые, ракушечниковые и остаточно-метасоматические. Для определения механизма растворения фосфатов из руд под воздействием гриба в процессе культивирования изучался состав метаболитов с помощью газовой хроматографии.

В результате проведенных исследований показано, что доступность фосфатных руд для *T. asperellum* зависит от происхождения руды и различается более чем в 100 раз. Наиболее доступными оказались океанические осадочные фосфориты. Из них в раствор переходило более 300 мг/л фосфата. Наименее доступными оказались экзогенные апатиты. Из них под воздействием *T. asperellum* фосфор в раствор не переходил. Эндогенные апатиты оказались несколько более доступными (50 мг/л), чем экзогенные.

Процесс высвобождения фосфатов из минерального сырья под действием штамма *T. asperellum* № 16 имеет сложный механизм, обусловленный как участием органических кислот, так и другими факторами, основным из которых является, по-видимому, выброс протонов при поглощении клетками иона аммония. Природа механизма до конца не выяснена также, как и для других микроорганизмов, для которых не наблюдается соответствия уровня продукции кислот и количества растворенного фосфата.

При использовании всех рассмотренных типов руд растворение фосфатов под воздействием штамма №16-GJS 03-35 *T. asperellum* происходило при участии глюконовой и кетоглюконовой кислот, которые являлись продуктом прямого окисления глюкозы с помощью ферментных систем гриба. При этом основную роль в процессе растворения фосфатов играла структура руды, а не количество продуцируемых грибом кислот. Так, в присутствии экзогенных апатитов (которые вообще не растворялись под действием гриба) в культуральной жидкости образовывалось в 2,5 раза больше кислот, чем в присутствии океанических фосфоритов (наиболее растворимых).

Наиболее важным в проведенных исследованиях является доказательство возможности высвобождения растворимых фосфатов под действием штамма *T. asperellum* № 16 из всех типов исследованных руд (океанические шельфовые, желваковые, апатитовые, ракушечные, остаточные метасоматические). Поэтому применение штамма *T. asperellum* № 16 совместно с доступными рудами может быть перспективно для улучшения фосфорного питания растений.

Проведенные исследования позволяют предложить примерный качественный и количественный состав комплексного биофосфорного удобрения на основе *T. asperellum* для решения задач продовольственной и экологической безопасности.

UDC 579.66 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-363-365

MECHANISM OF VARIOUS ROCK PHOSPHATES DISSOLUTION BY *TRICHODERMA ASPERELLUM* GJS 03-35

Zhigletsova S.K., Dunaytsev I.A., Kondrashenko T.N., Klykova M.V., Kolombet L.V.

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Federal Service of Surveillance in the Field of Consumer Right Protection and Human Welfare, Russia
142279 Moscow region, Serpukhov district, Obolensk
e-mail: zhigletsova @obolensk.org

The process of dissolution of mineral phosphorus raw materials under the influence of *Trichoderma asperellum* has a complex mechanism, due to both the participation of organic acids and other factors, the main of which is the emission of protons upon absorption of ammonium ion by cells.

Key words: rock phosphates; phosphate solubilizing microorganisms; *Trichoderma asperellum*; biophosphoric fertilizers

The possibility of using microorganisms to develop biophosphorus fertilizers in which the effective release of phosphorus from ores occurs directly in the field and does not harm the environment is attracting more and more attention. If microorganisms dissolving phosphate ore will have a number of other useful properties, for example, stimulate plant growth, suppress phytopathogens, etc., this will significantly increase the effectiveness of fertilizers based on them in increasing the quantity and quality of agricultural products.

As a result of screening, strain *T. asperellum* No. 16-GJS 03-35, an antagonist of many phytopathogens, and also plant growth promoter, was previously selected. The ability of *T. asperellum* species to release phosphorus

from tricalcium phosphate, a model analogue of rock phosphates, was shown for the first time. The combination of biologically and economically important properties of the selected fungus of the genus *Trichoderma* allows us to consider it as a promising producer of biological products of combined action - prolonged biophosphorus fertilizer with fungicidal properties. However, it is known that rock phosphates can differ in accessibility for one microorganism by more than 5 times, and under the influence of ore, the mechanism of phosphate release can change. Therefore, the aim of this study was to study the mechanism of phosphorus release from various types of rock phosphates under the influence of strain *T. asperellum* No. 16-GJS 03-35, which is necessary for the subsequent development of a combined biophosphorus fertilizer based on it.

To study the availability of phosphate ores of various genesis, the fungus was cultivated in a minimal mineral medium, where phosphate ores of 9 domestic and largest foreign deposits of various genesis were used as a source of phosphorus. We studied endogenous and exogenous apatites, as well as phosphorites - oceanic, nodular, shell lime, and residual metasomatic. To determine the mechanism of dissolution of phosphates from ores under the influence of the fungus during the cultivation, the composition of metabolites was studied using gas chromatography.

As a result of the studies, it was shown that the availability of rock phosphates for *T. asperellum* depends on the origin of the ore and differs by more than 100 times. The most accessible were oceanic sedimentary phosphorites. Of these, more than 300 mg / l of phosphate passed into the solution. Exogenous apatites turned out to be the least accessible. Of these, under the influence of *T. asperellum*, phosphorus did not pass into solution. Endogenous apatites were found to be slightly more accessible (50 mg / l) than exogenous.

The process of phosphate release from mineral raw materials under the influence of strain *T. asperellum* No.16 has a complex mechanism due to both the participation of organic acids and other factors, the main of which is apparently the emission of protons upon absorption of ammonium ion by the cells. The nature of the mechanism is not fully understood as well as for other microorganisms for which there is no correspondence between the level of acid production and the amount of dissolved phosphate.

When using all the considered types of ores, the dissolution of phosphates under the influence of strain *T. asperellum* No. 16-GJS 03-35 occurred with the participation of gluconic and ketogluconic acids, which were the product of direct oxidation of glucose using enzyme systems of the fungus. The main role in the dissolution of phosphates was played by the structure of the ore, and not by the amount of acid produced by the fungus. So, in the presence of exogenous apatite (which did not dissolve at all under the action of the fungus), 2.5 times more acids were formed in the culture liquid than in the presence of oceanic phosphorites (the most soluble).

The most important thing in the studies performed is the proof of the possibility of the release of soluble phosphates under the influence of *T. asperellum* strain No. 16 from all types of ores studied (oceanic shelf, jelly, apatite, shell, and residual metasomatic). Therefore, the use of strain *T. asperellum* No. 16 together with available rock phosphates can be promising for improving the phosphorus nutrition of plants.

The studies conducted allow us to propose an approximate qualitative and quantitative composition of complex biophosphorus fertilizer based on *T. asperellum* for solving food and environmental problems.

УДК 579.8:553.982 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-365-367

МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ В МЕСТОРОЖДЕНИЯХ ТЯЖЕЛОЙ НЕФТИ КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЙ УВЕЛИЧЕНИЯ НЕФТЕИЗВЛЕЧЕНИЯ

Соколова Д.Ш.¹, Бабич Т.Л.¹, Семёнова Е.М.¹, Груздев Д.С.², Биджиева С.Х.¹, Ершов А.П.¹, Сердюков Д.В.¹, Волков Д.С.³, Бугаев К.А.³, Хисаметдинов М.Р.⁴, Борзенков И.А.¹, Назина Т.Н.¹

¹ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

² Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

³ ООО «РИТЭК», Россия

⁴ Татарский научно-исследовательский и проектный институт нефти, Бугульма, Россия

119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, корп. 2

e-mail: sokolovadiyana@gmail.com

Микробиологический метод увеличения нефтеизвлечения, основанный на интродукции в пласт углеводородоокисляющих бактерий, окислителя в виде раствора H_2O_2 и солей азота и фосфора, предложен для месторождений тяжелой нефти. В результате опытно-промышленных испытаний метода на опытном участке Черемуховского месторождения было получено более 1140 т дополнительной тяжелой нефти.

Ключевые слова: нефтяные пласты, тяжелая нефть, микроорганизмы, гены 16S рРНК, высокопроизводительное секвенирование, биогеохимические процессы, микробные биотехнологии повышения нефтеотдачи.

Геологические запасы тяжелой и высоковязкой нефти в России достигают 6–7 млрд тонн. Их извлечение требует применения дорогостоящих технологий, что увеличивает себестоимость добычи. Биологическое воздействие на тяжёлую нефть может представлять альтернативный подход для повышения нефтеотдачи. В настоящее время информация о микроорганизмах месторождений тяжелой нефти остается фрагментарной. Целью работы было изучение разнообразия, активности и биотехнологического потенциала микроорганизмов для разработки биотехнологии увеличения нефтеизвлечения из месторождений тяжелой нефти России и проведение пилотных испытаний биотехнологии на нефтяных пластах (РФ). В ходе работы исследованы физико-химические условия и разнообразие микроорганизмов основных метаболических групп в пластовых водах месторождений тяжелой нефти (РФ). Показано, что заводняемые нефтяные пласты Черноозёрского, Южно-Сунчелеевского и Северо-Богемского нефтяных месторождений содержат малочисленное микробное сообщество. В заводняемых пластах Восточно-Анзирского и Черемуховского месторождений численность микроорганизмов достигала 10^6 кл/мл, однако аэробные нефтеокисляющие бактерии в них практически не обнаруживались. Скорости процессов сульфатредукции и метаногенеза были низки. С использованием метода высокопроизводительного секвенирования V3–V4 региона гена 16S рРНК был определен состав микробных сообществ в пробах нагнетаемой и пластовой воды Ромашкинского, Архангельского и Черемухинского месторождений нефти. Из нефтяных пластов были выделены аэробные органотрофные бактерии (*Gordonia amicalis*, *Rhodococcus erythropolis* и другие), образующие поверхностно-активные вещества при росте на углеводородах нефти, и анаэробные бродильные бактерии, образующие летучие кислоты и спирты из сахаросодержащих субстратов. С использованием культур нефтеокисляющих и бродильных бактерий из керновых моделей нефтяного пласта было получено 48 и 28% дополнительной нефти, соответственно, по сравнению с заводнением. Микробиологический метод увеличения нефтеотдачи, основанный на интродукции в пласт углеводородокисляющих бактерий, окислителя в виде раствора H_2O_2 и солей азота и фосфора, был опробован Черемуховском месторождении, что позволило получить более 1140 т дополнительной тяжелой нефти.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-00028).

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-365-367

MICROBIAL DIVERSITY IN HEAVY OIL RESERVOIRS AS A BASIS FOR DEVELOPMENT OF BIOTECHNOLOGIES FOR ENHANCED OIL RECOVERY

Sokolova D.S.¹, Babich T.L.¹, Semenova E.M.¹, Grouzdev D.S.², Bidzhieva S.K.¹, Ershov A.P.¹, Serdukov D.V.¹, Volkov D.S.³, Bugaev K.A.³, Khisametdinov M.R.⁴, Borzenkov I.A.¹, Nazina T.N.¹

¹ Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ RITEK Co., Moscow, Russia

⁴ Tatar Oil Research and Design Institute, Bugulma, Russia
 Leninsky prospect, 33, build. 2, Moscow, 119071, Russian Federation
 e-mail: sokolovadiyana@gmail.com

A microbiological method was proposed for enhanced oil recovery from heavy oil reservoirs, which is based on injection of hydrocarbon-oxidizing bacteria, an oxidant (H_2O_2 solution), and ammonium and phosphorus salts. Industrial trials at the experimental site of the Cheremukhovskoe oilfield resulted in additional recovery of heavy oil (over 1140 t).

Key words: oil reservoirs, heavy oil, microorganisms, 16S rRNA genes, high-throughput sequencing, biogeochemical processes, microbial enhanced oil recovery (MEOR).

The estimated reserves of heavy oil and bitumen in Russia are 6–7 billion tons. Existing methods applied for heavy oil recovery require expensive technologies, which significantly increases the cost of oil. Microbial methods for increasing heavy oil recovery may be a good alternative. The aim of the present work was to study the diversity and activity of microorganisms from reservoirs of heavy oil (Russia) and their biotechnological potential in order to develop the microbiological method for enhanced recovery of heavy oil (MEOR), and to perform a pilot trial of the MEOR technique at the oilfield. Physicochemical conditions and cell numbers of the microorganisms of the main metabolic groups in heavy oil reservoirs (Russia) were determined. In oilfields exploited without water-

flooding, Chernoozerskoe, Yuzhno-Sunchelevskoe and Severo-Bogemskoe oilfields, microbial populations were scarce. In water-flooded Vostochno-Anzirsckoe and Cheremukhovskoe oil fields, microbial abundance was as high as 10^6 cells/mL, although almost no aerobic oil-oxidizing bacteria were detected. The rates of sulfate reduction and methanogenesis were low. High-throughput sequencing of the V3–V4 region of the 16S rRNA genes was used to determine the composition of microbial communities in the samples of injection and formation water from the Romashkinskoe, Arkhangelskoe, and Cheremukhovskoe petroleum reservoirs. Aerobic organotrophic bacteria (*Gordonia amicalis*, *Rhodococcus erythropolis* and others) capable of biosurfactant production when growth on hydrocarbons, and anaerobic fermentative bacteria producing short-chain fatty acids and alcohols from sugar-containing substrates were isolated from formation water. The cultures of oil-oxidizing aerobic bacteria and of fermentative bacteria were used in core flooding experiments, resulting in additional oil displacement of 48 and 28%, respectively, compared to water flooding. A field pilot experiment for enhancing oil recovery involving injection of oil-oxidizing bacteria, oxygen (as an H_2O_2 solution), and salts of nitrogen and phosphorus into the reservoir was carried out at the Cheremukhovskoe oilfield; as a consequence of applying this biotechnology, 1140 tons of heavy oil was additionally recovered.

This work was supported by Russian Science Foundation, grant no. 16-14-00028.

УДК 550.72:579.66 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-367-368

ОБРАЗОВАНИЕ СУЛЬФИДОВ ЖЕЛЕЗА СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ ИЗ ГЕОТЕРМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМ

Франк Ю. А.^{1,2}, Анциферов Д. В.¹, Лукина А. П.¹, Иккерт О. П.¹

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия
634050, Томск, пр. Ленина, д.36

² АО «Томский научно-исследовательский и проектный институт нефти и газа» (ТомскНИПИнефть), Томск, Россия
634027, Томск, пр. Мира, д.72
e-mail: yulia.a.frank@gmail.com

Изучены кристаллические фазы в биогенных осадках, образованных *Desulfotomaculum* sp. DPr и *Desulfovibrio* sp. KZ1 из геотермальных источников. Обнаружены сульфиды железа – марказит (FeS_2), мельниковит (FeS_xH_2O) и грейгит (Fe_3S_4). Отмечено, что состав кристаллической фазы зависит от физико-химических условий среды. Выявлена ассоциация кристаллов с поверхностью клеток, мембранами и периплазматическим пространством. Во внутриклеточной кристаллизации предположительно задействованы системы, отвечающие за транспорт или хелатирование катионов.

Ключевые слова: сульфатредуцирующие бактерии; биогенные осадки; сульфиды металлов; кристаллические сульфиды железа.

Прокариоты геотермальных подземных местообитаний являются агентами образования и растворения минералов, в том числе мобилизации и осаждения металлов. Геохимическая роль сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) связана с выведением металлов из круговорота за счет образования сульфидов с низкой растворимостью. Образование биогенных сульфидов железа, например, пирита, под действием СРБ имеет глобальное биогеохимическое значение. Подобные реакции микроорганизмов могут быть использованы для получения промышленно значимых кристаллических сульфидов металлов.

Целью работы является изучение кристаллических фаз в биогенных осадках, образованных СРБ из геотермальных источников в присутствии железа, и уточнение механизмов образования кристаллов на клеточном уровне. В данном исследовании использованы чистые культуры *Desulfotomaculum* sp. DPr (Pertosocaseae, Firmicutes), выделенного из термальной воды глубинной нефтепоисковой скважины в Западной Сибири, и *Desulfovibrio* sp. KZ1 (Desulfovibrionaceae, Deltaproteobacteria), выделенного из микробного мата на изливе геотермальной скважины в Казахстане.

По результатам XRD-анализа в осадке, полученном в культуре *Desulfovibrio* sp. KZ1 в присутствии железа (50 мг/л) при 15 °C и pH 6.5 были обнаружены три кристаллические фазы, две из которых соответствуют сульфидам железа – марказиту (FeS_2) и мельниковиту (FeS_xH_2O). При более высоких значениях pH (8.0) биогенных сульфидов железа не было получено. Единственным сульфидом железа, образованным термофильным *Desulfotomaculum* sp. DPr при 50 °C в присутствии железа (до 1000 мг/л) при pH 5.0 и 7.0 был грейгит (Fe_3S_4). В абиотических контролях сульфидных минералов железа обнаружено не было.

Результаты исследования ультратонких срезов клеток подтвердили ассоциацию кристаллов с

поверхностью клеток, мембранами и периплазматическим пространством. Во внутриклеточной кристаллизации предположительно задействованы системы, отвечающие за транспорт или хелатирование катионов, такие как ABC-транспортеры или металлсвязывающие белки.

Данное научное исследование выполнено при поддержке РФФИ (проект № 18-34-00535 и проект № 18-04-00181).

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-367-368

FORMATION OF IRON SULFIDES BY SULPHATE-REDUCING BACTERIA FROM GEOTHERMAL ECOSYSTEMS

Frank Y. A.^{1,2}, Antsiferov D. V.¹, Lukina A. P.¹, Ikkert O. P.¹

¹ National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

634050, Tomsk, Lenina Ave., 36

² Tomsk Oil and Gas Research and Design Institute (TomskNIPneft), Tomsk, Russia

634027, Tomsk, Mira Ave., 72

e-mail: yulia.a.frank@gmail.com

Crystalline phases in biogenic sediments formed by *Desulfotomaculum sp. DPr* and *Desulfovibrio sp. KZ1* from geothermal sources were studied. Marcasite (FeS_2), melnikovite ($\text{FeS}_x\text{H}_2\text{O}$) and greigite (Fe_3S_4) were detected. Composition of the crystalline phase depends on the physicochemical conditions of the environment. The association of crystals with the cell surface, membranes and periplasmic space was revealed. Intracellular crystallization presumably involves systems responsible for the transport or cation chelation.

Key words: sulfate-reducing bacteria; biogenic precipitation; metal sulfides; crystalline iron sulfides.

Prokaryotes in geothermal underground habitats are involved in formation and dissolution of minerals, including the mobilization and deposition of metals. The geochemical role of sulfate-reducing bacteria (SRB) is associated with the deposition of metals due to the formation of sulfides with low solubility. The formation of biogenic iron sulfides, for example, pyrite, under the activity of SRB is of global biogeochemical significance. Similar reactions of microorganisms can be used to obtain industrially applicable crystalline metal sulfides.

The work aimed to study crystalline phases in biogenic sediments formed by SRB from geothermal sources in the presence of iron, and to clarify the mechanisms of the crystal formation process at the cell level. In this study, we used pure cultures of *Desulfotomaculum sp. DPr* (Peptococcaceae, Firmicutes) isolated from the thermal water of a deep oil exploration well in West Siberia, and *Desulfovibrio sp. KZ1* (Desulfovibrionaceae, Deltaproteobacteria) isolated from a microbial mat on the outflow of a geothermal well in Kazakhstan.

According to the results of XRD analysis of the sediment obtained in the culture of *Desulfovibrio sp. KZ1* in the presence of iron (50 mg / L) at 15 °C and pH 6.5, three crystalline phases were found, two of which correspond to iron sulfides – marcasite (FeS_2) and melnikovite ($\text{FeS}_x\text{H}_2\text{O}$). At higher pH (8.0), biogenic iron sulfides were not obtained. The only iron sulfide formed by the thermophilic *Desulfotomaculum sp. DPr* at 50 °C in the presence of iron (up to 1000 mg / L) at pH 5.0 and 7.0 was greigite (Fe_3S_4). No iron sulfide minerals were found in abiotic controls.

The results of the study of ultrathin sections confirmed the association of crystals with the cell surface, membranes and periplasmic space. Intracellular crystallization probably involves systems responsible for the transport or chelation of cations, such as ABC transporters or metal-binding proteins.

This research was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project No. 18-34-00535 and project No. 18-04-00181).

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

GENETIC RESOURCES AND BIOTECHNOLOGY PROCESSES IN FOOD INDUSTRY

Руководители

А.Б. Лисицын академик РАН, научный руководитель ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова/

A.B. Lisitsyn academician of RAS, director of Gorbatov FGBNU VNIIMP

Е.М. Серба д.б.н., профессор РАН, зам.директора института пищевой биотехнологии ВНИИПБТ/

E.M. Serba doctor of science (Biology), professor of RAS, deputy head of VNIIPBT

В.Д. Харитонов академик РАН, профессор, д.т.н., научный руководитель ГНУ ВНИИ молочной промышленности/

V. D. Kharitonov academician of RAS, professor, doctor of science (Technology), science director of National Research Institute of Dairy Industry

| | |
|---|-----|
| 1. ВЛИЯНИЕ МИКРОБНОГО СОДЕРЖАНИЯ КОРОВЬЕГО МОЛОКА НА НЕЙТРОФИЛЫ И КЛЕТКИ CD4+ МОЛОКА Бечева З.Р., Атанасова М.К., Иванов Я.Л., Годжеваргова Ц.И. | 372 |
| COW MILK MICROBIAL CONTENT INFLUENCE ON NEUTROPHILS AND CD4+ MILK CELLS Becheva Z.R., Atanasova M.K., Ivanov Y.L., Godjevargova T.I. | 373 |
| 2. ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТА ИЗ БИОМАССЫ НИЗШИХ ГРИБОВ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ КОНСЕРВОВ, СОДЕРЖАЩИХ ДЕФРОСТИРОВАННЫЕ РАСТИТЕЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ Юшина Е.А., Богуш В.И., Новикова Ж.В., Сергеева С.М., Лисовский А.В. | 374 |
| APPLICATION OF THE PRODUCT FROM THE LOW MUSHROOM BIOMASS IN THE PRODUCTION OF CANNED CONTAINING DEFROSTED VEGETABLE COMPONENTS Yushina E.A., Bogush V.I., Novikova Zh.V., Sergeeva S.M., Lisovskii A.V. | 375 |
| 3. МИКРОБНЫЕ НУТРИПАРАФАРМАЦЕВТИКИ НА КОМПЛЕКСНОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ Борисенко Е.Г., Родригес В.И., Зуев Р.А., Молиер А. | 376 |
| MICROBIAL NUTRIPARAPHARMACEUTICALS IN AN INTEGRATED VEGETABLE EDIBLE RAW MATERIAL Borisenko Y.G., Zuev R.A., Moliere A. | 377 |
| 4. ЭКСПРЕССНЫЙ КОНТРОЛЬ АНТИБИОТИКА БАЦИТРИЦИНА В МОЛОКЕ: РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ Бызова Н.А., Серченя Т.С., Вашкевич И.И., Жердев А.В., Свиридов О.В., Дзантиев Б.Б. | 378 |
| EXPRESS CONTROL OF ANTIBIOTIC BACITRACIN IN MILK: DEVELOPMENT AND TESTING OF AN IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEM Vyzova N.A., Serchenya T.S., Vashkevich I. I., Zherdev A.V., Sviridov O.V., Dzantiev B.B. | 379 |
| 5. РАЗРАБОТКА БЫСТРОГО И НЕДОРОГО НЕДЕСТРУКТИВНОГО АНАЛИТИЧЕСКОГО МЕТОДА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТОЯНИЯ СВЕЖЕСТИ НЕКОТОРЫХ ОСЕТРОВЫХ ВИДОВ РЫБ ОБРАБОТАННЫХ РАСТВОРОМ ПАСЛЕНА Д.Д.Вилкова, М.А.Егоров, Е.И.Кондратенко, Р.Каруи | 380 |
| DEVELOPMENT OF NON-DESTRUCTIVE RAPID AND LOW-COST ANALYTICAL TECHNIQUE FOR THE DETERMINATION OF THE FRESHNESS STATE OF STURGEON SPECIES IMMERSSED IN NIGHTSHADE SOLUTION D.Vilkova, M.Egorov, E.Kondratenko, R.Karoui | 381 |
| 6. ПРИНЦИП ИДЕНТИФИКАЦИИ ТКАНЕ- И ВИДОСПЕЦИФИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ БЕЛКОВО-ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ЖИВОТНЫХ Вострикова Н. Л., Чернуха И. М., Хвостов Д. В. | 383 |
| THE PRINCIPLE OF IDENTIFICATION OF TISSUE- AND SPECIES-SPECIFIC SUBSTANCES OF PROTEIN-PEPTIDE NATURE IN MUSCLE TISSUE OF ANIMALS Vostrikova N. L., Chernukha I. M., Khvostov D. V. | 384 |

| | |
|---|-----|
| 7. ПИГМЕНТНЫЙ СОСТАВ ЗЕЛЁНОЙ ВОДОРΟΣЛИ НАЕМАТОСОССУС PLUVIALIS В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ НЕСКОЛЬКИХ ИНДУКТОРОВ НАКОПЛЕНИЯ АСТАКСАНТИНА Вязов Е.В., Гончарик Р.Г., Куликов Е.А., Селищева А.А. | 386 |
| PIGMENT COMPOSITION OF THE GREEN ALGA НАЕМАТОСОССУС PLUVIALIS DURING ACTION OF MULTIPLE ASTAXANTHIN ACCUMULATION INDUCTORS Viazau Y.V., Goncharik R.G., Kulikov E.A., Selishcheva A.A. | 387 |
| 8. ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ СТАБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ХРАНЕНИИ Галуза О.А., Николаев Ю.А., Уланова2 Р.В., Шакир И.В., Хрептугова А.Н. | 388 |
| INVESTIGATION OF VARIOUS WAYS TO STABILIZE LACTIC ACID BACTERIA CELLS DURING LONG-TERM STORAGE Galuza O.A., Nikolaev Yu.A., Ulanova R.V., Shakir I.V., Khreptugova A.N. | 389 |
| 9. НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА АЦЕТОИНА У БАКТЕРИЙ РОДА BACILLUS Гераскина Н.В., Федорова Е.Н., Киверо А.Д., Стойнова Н.В. | 390 |
| SOME FEATURES OF AN ACETOIN BIOSYNTHESIS BY BACTERIA FROM THE GENUS BACILLUS Geraskina N.V., Fedorova E.N., Kivero A.D., Stoynova N.V. | 391 |
| 10. ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ ГРЕЧИХИ НА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ЦЕННЫЕ СВОЙСТВА LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS Гребенщикова А. В., Иркитова А. Н., Дудник Д. Е. | 392 |
| EFFECT OF BUCKWHEAT EXTRACTS ON VALUABLE BIOTECHNOLOGICAL PROPERTIES OF LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS Grebenschikova A. V., Irkitova A. N., Dudnik D. E. | 393 |
| 11. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПЕКТИНОСОДЕРЖАЩИХ СМЕСЕЙ В ЭНТЕРАЛЬНОЙ КОРРЕКЦИИ ТРОФОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА Демидова Т. И., Демидов Д. А., Орешкин Е. Н. | 394 |
| RESEARCH OF MEDICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF SPECIALIZED PECTIN-CONTAINING MIXTURES I N THE ETHERAL CORRECTION OF THE TROPHOLOGICAL STATUS Demidova T. I., Demidov D. A., Oreshkin E.N. | 395 |
| 12. ВЛИЯНИЕ ТОЧЕЧНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В МОЛЕКУЛЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА КОРОВЫ НА ЗАВИСИМОСТЬ ЕГО КОАГУЛЯЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ХЛОРИДА КАЛЬЦИЯ В МОЛОКЕ Балабова Д.В., Миронова А.В., Пушкарев В.А., Афанасьева Ю.Г., Щербakov Д.Н., Рудометов А.П., Ельчанинов В.В. | 396 |
| INFLUENCE OF POINT AMINO ACID SUBSTITUTIONS IN THE RECOMBINANT COW CHYMOSIN MOLECULE ON THE DEPENDENCE OF ITS COAGULATION ACTIVITY ON THE CONCENTRATION OF CALCIUM CHLORIDE IN MILK Balabova D.V., Mironova A.V., Pushkarev V.A., Afanasieva J.G., Shcherbakov D.N., Rudometov A.P., Elchaninov V.V. | 398 |
| 13. ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ: РАЗРАБОТКА И ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ КОНТРОЛЕ РАЗЛИЧНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ Сотников Д.В., Жердев А.В., Зверева Е.А., Гендриксон О.Д., Бартош А.В., Дзантиев Б.Б. | 399 |
| IMMUNOCHROMATOGRAPHIC SYSTEMS FOR DETECTING ANTIBIOTICS: DEVELOPMENT AND FEATURES OF APPLICATION IN THE CONTROL OF VARIOUS FOOD PRODUCTS Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Zvereva E.A., Hendrickson O.D., Bartosh A.V., Dzantiev B.B. | 400 |
| 14. ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ЦИТОМОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ДРОЖЖЕЙ SACHAROMYCES CEREVISIAE ПРИ СБРАЖИВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ПЛОДОВО-ЯГОДНОГО СУСЛА Жилинская Н.Т., Шитова А.С., Анисимова И.Н. | 401 |
| DYNAMICS OF SACHAROMYCES CEREVISIAE YEAST CYTOMORPHOMETRIC CHARACTERISTIC CHANGES DURING FRUIT AND BERRY WORT FERMENTATION Zhilinskaya N. T., Shitova A.S., Anisimova I.N. | 402 |
| 15. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОХРАТОКСИНА А Бечева З.Р., Атанасова М.К., Иванов Я.Л., Годжеваргова Ц.И. | 403 |
| MAGNETIC NANOPARTICLE BASED FLUORESCENCE IMMUNOASSAY FOR DETERMINATION OF OCHRATOXIN A Becheva Z.R., Atanasova M.K., Ivanov Y.L., Godjevargova T.I. | 404 |
| 16. ПИЩЕВЫЕ ЛЕСНЫЕ РЕСУРСЫ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО РЕГИОНА Корякина Н.А., Степакова Н.Н. | 405 |
| FOOD FOREST RESOURCES OF THE FAR EASTERN REGION Koryakina N.A., Stepakova N.N. | 406 |

| | |
|---|-----|
| 17. ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРОТЕАЗ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ БЕЗ ГОРЕЧИ Костылева Е.В., Серeda А.С., Великорецкая И.А., Минеева Д.Т., Цурикова Н.В. | 407 |
| PREPARATIONS OF BACTERIAL PROTEASES FOR THE PRODUCTION OF PROTEIN HYDROLYSATES WITHOUT BITTERNESS Kostyleva E.V., Sereda A.S., Velikoretskaya I.A., Mineeva D.T., Tsurikova N.V. | 408 |
| 18. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ ЗЕРНА ГОРОХА В ПИЩЕВЫЕ И КОРМОВЫЕ БЕЛКОВЫЕ КОНЦЕНТРАТЫ Д.С.Куликов, Р.В.Уланова, В.А.Гулакова, В.В.Колпакова..... | 409 |
| BIOTRANSFORMATION OF COMPONENTS OF PEA GRAIN IN FOOD AND FODDER PROTEIN CONCENTRATES D.Kulikov, R.Ulanova, V.Gulakova, V.Kolpakova..... | 410 |
| 19. ИННОВАЦИОННЫЙ ДЕЗИНФЕКТАНТ «АВЕРДЕЗ» КАК ФАКТОР, СПОСОБСТВУЮЩИЙ РЕАЛИЗАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРОДУКТИВНОСТИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ Мирзаева К.М., Глухова П.Ю, Мирзаев М.Н., Кулица М.М..... | 411 |
| INNOVATIONAL DISINFECTANT «AVERDEZ» AS A FACTOR FACILITATING THE IMPLEMENTATION OF THE GENETIC POTENTIAL OF PRODUCTIVITY OF AGRICULTURAL ANIMALS Mirzaeva K.M., Glukhova P.Yu, Mirzaev M.N., Kylitsa M.M..... | 413 |
| 20. ИННОВАЦИОННАЯ КОМПЛЕКСНАЯ ПИЩЕВАЯ ДОБАВКА «МЕЛАДЕЗ» ДЛЯ МЯСОПЕРЕРАБАТЫВАЮЩИХ ПРОИЗВОДСТВ Мирзаева К.М., Зверьков Д.А., Мирзаев М.Н. | 414 |
| INNOVATIONAL COMPLEX FOOD ADDITIVE «MELADES» FOR MEAT PROCESSING PRODUCTS Mirzaeva K.M., Zverkov D.A., Mirzaev M.N. | 415 |
| 21. НОВЫЙ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПИЩЕВОЙ ИНГРЕДИЕНТ АДАПТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ Н.А.Петров, С.Н.Зорин, Ю.С.Сидорова, В.К.Мазо | 416 |
| NEW FUNCTIONAL FOOD INGREDIENT FROM SPINACH LEAVES N.Petrov, S.Zorin, Y.Sidorova, V.Mazo..... | 417 |
| 22. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАПИТКОВ НА ОСНОВЕ КЛУБНЕЙ ТОПИНАМБУРА Плотникова В.Е., Шевченко В.А., Кареткин Б.А., Шакир И.В., панфилов В.И. | 418 |
| THE STUDY ON PROBIOTIC FUNCTIONAL BEVERAGES WITH JERUSALEM ARTICHOKE TUBERS Plotnikova V.E., Shevchenko V.A., Karetkin B.A., Shakir I.V., Panfilov V.I. | 419 |
| 23. РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ТРОПОНИН I И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ Д.С.Поправко..... | 420 |
| DEVELOPMENT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST-SYSTEM FOR TROPONIN I AND ITS APPLICATION FOR CONTROL OF MEAT PRODUCTS D.Popravko | 421 |
| 24. НОВЫЙ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ АГРЕГАТООБРАЗУЮЩИЙ ПРОДУЦЕНТ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА Е.Р. Митина, А.Б. Пшеничникова..... | 422 |
| NEW BACTERIAL AGGREGATE-FORMING PRODUCER OF POLY-3-HYDROXYBUTYRATE E.R. Mitina, A.B. Pshenichnikova..... | 423 |
| 25. НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ ПЕРЕРАБОТКИ МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДРОЖЖЕЙ Рябцева С. А., Храмов А.Г., Шпак М.А., Сазанова С.Н., Ермаков В.А. | 423 |
| NEW DIRECTIONS IN BIOTECHNOLOGY OF DAIRY RAW MATERIALS PROCESSING USING YEAST Ryabtseva S.A., Khramtsov A.G, Shpak M.A., Sazanova S.N., Ermakov V.A. | 424 |
| 26. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ НА ОСНОВЕ КОНВЕРСИИ БИОРЕСУРСОВ ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ Сербa Е.М., Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Погоржельская Н.С., Поливановская Д.В., Абрамова И.М. | 425 |
| BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF OBTAINING FUNCTIONAL INGREDIENTS BASED ON THE CONVERSION OF FOOD PRODUCTION BIORESOURCES Serba E.M., Rimareva L.V., Overchenko M.B., Ignatova N.I., Pogorzhelskaya N.S., Polyvanovskaya D.V., Abramova I.M. | 426 |
| 27. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЯЙЦЕПРОДУКТОВ, ОБОГАЩЕННЫХ ПОЛИФЕНОЛАМИ Стефанова И.Л., Мазо В.К., Клименкова А.Ю., Кропачева Е.В., Перова И.Б. | 427 |
| THE NEW TECHNOLOGY OF FUNCTIONAL EGG BASED PRODUCTS ENRICHED WITH POLYPHENOLS Stefanova I.L., Mazo V.K., Klimenkova A.Yu., Kropacheva E.V., Perova I.B. | 428 |

| | |
|--|-----|
| 28. МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССИНГА АЛЛЕРГЕНА ЧЕЧЕВИЦЫ LEN C 3 ПРИ ПРИГОТОВЛЕНИИ ПИЩИ И ПЕРЕВАРИВАНИИ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ Финкина Е.И., Богданов И.В., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В. | 429 |
| SIMULATION OF THE LENTIL ALLERGEN LEN C 3 PROCESSING DURING COOKING AND GASTRODUODENAL DIGESTION Finkina E.I., Bogdanov I.V., Melnikova D.N., Ovchinnikova T.V. | 429 |
| 29. ВИДЫ МЯТЫ, ПРОИЗРАСТАЮЩИЕ НА КАВКАЗЕ И ИМЕЮЩИЕ ПИЩЕВОЕ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ Цибульская А.Р. Рыбалко А.А., Шмат Е.В. | 430 |
| SPECIES OF MINT GROWING IN THE CAUCASUS AND HAVING FOOD AND PHARMACEUTICAL IMPORTANCE. Tsibul'skaya A.R. Rybalko A.A., Shmat E.V. | 431 |
| 30. СТАБИЛИЗАЦИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ С ПОМОЩЬЮ БИОДОБАВКИ ИЗ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ Юшина Е.А., Красуля О.Н., Новикова Ж.В., Григорьевская И.И., Сергеева С.М., Цыганкова А.А. | 432 |
| STABILIZATION OF FOOD PRODUCTS BY MEANS OF BIO-SUPPLEMENTS FROM MICROSCOPIC MUSHROOMS Yushina E.A., Krasulya O.N., Novikova Zh.V., Grigoryevskaya I.I., Sergeeva S.M., Cygankova A.A. | 433 |

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-372-373

ВЛИЯНИЕ МИКРОБНОГО СОДЕРЖАНИЯ КОРОВЬЕГО МОЛОКА НА НЕЙТРОФИЛЫ И КЛЕТКИ CD4⁺ МОЛОКА

Бечева З.Р., Атанасова М.К., Иванов Я.Л., Годжеваргова Ц.И.

Кафедра биотехнологии, Технический факультет, Университет Проф. д-р Асена Златарова, Бургас, Болгария
e-mail: godjevargova@yahoo.com

Целью данного исследования было определение общего количества клеток и некоторых патогенных микроорганизмов в 105 пробах молока. Количество соматических клеток (КСК) было значительно выше в образцах ма­ститного молока по сравнению с образцами неинфицированного и загрязненного молока. Общего микробного числа (ОМЧ) в загрязненном и ма­ститном молоке было в 5-20 раз больше, чем в образцах здорового молока. Изучено влияние выбранных патогенных микроорганизмов на количество соматических клеток, нейтрофилов и клеток CD4⁺. Показана корреляция результатов, полученных двумя методами - флуоресцентного автоматического счетчика клеток Lactoscan SCC и проточной цитометрии Guava easyCyte™ 8HT. Показано, что на долю различных типов клеток (нейтрофилов и клеток CD4⁺) влияет тип патогенов.

Ключевые слова: количества соматических клеток, нейтрофилов, CD4, проточной цитометрии, флуоресцентного автоматического счетчика клеток

Целью данного исследования было определение общего количества клеток и некоторых патогенных микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и Coliforms) в 105 пробах молока с использованием микробиологических методов в качестве референсных. В зависимости от ОМЧ и КСК, выявленных во всех пробах молока, они были разделены на три группы - здоровое (16 проб), загрязненное (12 проб) и ма­ститное (75 проб) молоко. КСК было значительно выше в образцах ма­ститного молока по сравнению с образцами неинфицированного и загрязненного молока. ОМЧ в загрязненном и ма­ститном молоке было в 5-20 раз больше, чем в образцах здорового молока. Количество клеток *Staphylococcus aureus* в образцах ма­ститного молока было самым высоким. Кроме того, в пробах загрязненного молока доля Coliforms была значительной. Причиной этого, вероятно, была плохая гигиена коров.

Изучено влияние выбранных патогенных микроорганизмов на количество соматических клеток, нейтрофилов и клеток CD4⁺. Эти показатели были определены с помощью нового флуоресцентного автоматического счетчика клеток Lactoscan SCC. Результаты количественного определения соматических клеток, нейтрофилов и CD4⁺ были подтверждены с помощью проточной цитометрии (Guava easyCyte™ 8HT). Показана корреляция результатов, полученных двумя методами. Количество нейтрофилов в образцах увеличивалось значительно от 17,3% в неинфицированном молоке до 80% в образцах ма­ститного молока. По мере увеличения КСК процент нейтрофилов увеличивался. Количество нейтрофилов является важным показателем ранних стадий инфекции, поскольку на ранней стадии воспалительного ответа большое количество нейтрофилов передается из крови в молоко. Большинство образцов молока характеризовались высоким уровнем стафилококковых колониеобразующих единиц. Было отмечено, что в образцах

со стафилококковым маститом количество клеток CD4⁺ было несколько выше чем в образцах здорового молока. Напротив, в образцах с *Escherichia coli* и Coliforms, количество клеток CD4⁺ было ниже, чем в образцах здорового молока. Таким образом, результаты настоящего исследования доказывают, что флуоресцентный цитометр Lactoscan является хорошей альтернативой проточному цитометру для подсчета количества соматических клеток, нейтрофилов и CD4⁺. Было показано, что количество нейтрофилов и CD4⁺ лимфоцитов в молоке является более надежным признаком выявления инфекции на ранних стадиях, чем определение КСК или бактериологическое исследование. Показано, что на долю различных типов клеток (нейтрофилов и клеток CD4⁺) влияет тип патогенов.

Работа выполнена при поддержке Болгарский национальный научный фонд, программа двустороннего сотрудничества, проект № ДНТС/Россия 02/10, 2018.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-372-373

COW MILK MICROBIAL CONTENT INFLUENCE ON NEUTROPHILS AND CD4⁺ MILK CELLS

Becheva Z.R., Atanasova M.K., Ivanov Y.L., Godjevargova T.I.

Department of Biotechnology, Faculty of Technical Science, "Prof. Dr Asen Zlatarov" University, Burgas, Bulgaria
e-mail: godjevargova@yahoo.com

The purpose of this research was to determine the total cell count and some pathogenic microorganisms in 105 milk samples. The somatic cell count (SCC) was significantly higher in mastitic milk samples compared to the uninfected glands and dirty milk samples. The total number of microorganisms (TBC) in dirty and mastitic milk was 5-20 times more than results in healthy milk samples. The influence of the selected pathogenic microorganisms on the number of somatic cells, neutrophils and CD4⁺ cells was studied. The obtained results were compared with those by a flow cytometer Guava easyCyteTM 8HT. The proportion of different cell types (neutrophils and CD4⁺ cells) has been shown to be influenced by the type of pathogens.

Key words: somatic cell count, neutrophil, CD4, flow cytometer, automatic cell counter

The purpose of this research was to determine the total cell count and some pathogenic microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and Coliforms) in 105 milk samples by using reference microbiological methods. Depending on the TBC and SCC identified in all milk samples, they were grouped into three groups – healthy (16 samples), dirty (12 samples) and mastitic (75 samples) milks. The SCC was significantly higher in mastitic milk samples compared to the uninfected glands and dirty milk samples. The TBC in dirty and mastitic milk was 5-20 times more than results in healthy milk samples. The count of *Staphylococcus aureus* cells in mastitic milk samples was the highest. Besides that, the proportion of Coliforms in dirty milk samples was significant. The reason for this was probably the poor cow hygiene.

The influence of the selected pathogenic microorganisms on the number of somatic cells, neutrophils and CD4⁺ cells was studied. The latest were counting by using a new fluorescent automatic cell counter Lactoscan SCC. The obtained results for SCC, neutrophils and CD4⁺ cell count were compared with those by a flow cytometer Guava easyCyteTM 8HT. The results obtained by the two methods are relatively similar. The neutrophil count was varied significantly from 17.3% in uninfected to 80% in mastitic milk samples. As the SCC increases, the percentage of neutrophils increases. The neutrophil count is a valuable indicator of the early stages of infection, since in the early phase of the inflammatory response, a large number of neutrophils pass from the blood to the milk. The most milk samples have high staphylococcus colony-forming units and, consequently, they contain staphylococcal mastitis. It was observed that in the samples with staphylococcal mastitis the count of CD4⁺ cells was slightly higher compared to the results in healthy milk samples. Contrary in small number of samples with a high *Escherichia coli* and Coliforms count, the CD4⁺ cell count was lower than in the healthy milk samples. In conclusion, the findings of the present study prove that the Lactoscan fluorescence cytometer is a good alternative to the flow cytometer for counting SCC, neutrophils and CD4⁺ cells. It was proved that the number of neutrophils and CD4⁺ lymphocytes in the milk are a more reliable sign for differentiation in early phases of infection than SCC or bacteriological examination. The proportion of different cell types (neutrophils and CD4⁺ cells) has been shown to be influenced by the type of pathogens.

This work was supported by the Bulgarian National Science Fund, bilateral cooperation program, project no. DNTS 02/10, 2018.

УДК 573.6.086.83 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-374-375

ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТА ИЗ БИОМАССЫ НИЗШИХ ГРИБОВ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ КОНСЕРВОВ, СОДЕРЖАЩИХ ДЕФРОСТИРОВАННЫЕ РАСТИТЕЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ

Юшина Е.А., Богуш В.И., Новикова Ж.В., Сергеева С.М., Лисовский А.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств», Москва, Россия
125080, Москва, Волоколамское шоссе, дом.11
e-mail: Vladimir2001@yandex.ru

Применение препарата из биомассы микромицета *Mortierella alliaseae* в технологии производства стерилизуемых консервов с использованием дефростированного растительного сырья повышает цветостабильность и улучшает консистенцию готового продукта.

Ключевые слова: дефростированные растительные компоненты, микромицет *Mortierella alliaseae*, полиненасыщенные жирные кислоты, хитозан, цветостабильность

Применение препарата из биомассы микроскопических грибов *Mortierella alliaseae* позволяет повысить надежность предотвращения разваривания дефростированных растительных компонентов и цветостабильность готового продукта.

Способ реализуется следующим образом. Сухую биомассу микромицета *Mortierella alliaseae* экстрагируют неполярным экстрагентом, например, двуокисью углерода или гексаном, в надкритическом состоянии. На этой стадии экстрагирования отделяют первый экстракт, используемый в дальнейшем при получении препарата. Далее биомассу последовательно экстрагируют водой, щелочью, водой, кислотой, водой, щелочью и водой. Полученный после завершения всех перечисленных стадий экстрагирования твердый остаток объединяют с первым экстрактом с получением препарата, который вводят в приготавливаемую заливочную жидкость.

В реакцию со свободными карбоксильными группами пектиновых веществ растительного сырья вступает входящий в состав препарата из биомассы микромицета *Mortierella alliaseae*, хитозан. Это приводит не только к кратному соединению смежных молекул пектиновых веществ, но и дополнительно к увеличению длины полимерных цепей при сополимеризации пектина и хитозана. Нарастание массы структурообразующих веществ при таком способе оказывается выше, чем в наиболее близком аналоге, что повышает надежность предохранения от разваривания дефростированных растительных компонентов.

Одновременно следует отметить, что повреждение клеток растительного сырья приводит к повышению доступности красящих веществ, что повышает вероятность изменения цвета, в первую очередь, дефростированных компонентов. Опытным путем установлено, что консервы, полученные таким способом, отличаются более высокой цветостабильностью.

Как пример, готовят консервы «Свинина с горохом» с использованием дефростированного зеленого горошка и моркови кусочками, препарата из биомассы микромицета *Mortierella alliaseae*. Препарат получен с использованием в качестве неполярного экстрагента гексана в опытных консервах и хлористого магния в контрольных консервах при следующем соотношении компонентов, мас.ч.: Свинина – 400; Жир животный – 30; Горох – 28; Морковь – 28; Лук – 75; Соль поваренная -12; Перец черный молотый – 0,12; Лавровый лист – 0,1; Хлористый магний или препарат из биомассы *Mortierella alliaseae* – 0,04; Вода – 177,74. После стерилизации зерно горошка и моркови сохраняют первоначальную форму в обеих партиях консервов. Цвет этих компонентов в опытной партии консервов заметно ярче, чем в контрольной, морковь коричневеет в меньшей степени.

Таким образом, применение препарата из биомассы микромицета *Mortierella alliaseae* позволяет повысить надежность получения качественной продукции из дефростированного растительного сырья как по консистенции, так и по цветостабильности.

Литература

1. Eroshin V.K., Dedyukina E.G. Effect of lipids from *Mortierella hygrophila* on plant resistance to phytopathogens // *World J. of Microbiol. & Biotechnol.* 2002.-Vol.18.-P.165-167.
2. Ерошин В.К., Дедюхина Э.Г. и др. Исследование синтеза арахидоновой кислоты грибами рода *Mortierella*: микробиологический метод селекции продуцентов арахидоновой кислоты// *Микробиология.* 1996.- Т.65, вып.1.- с. 31-36.

UDC 573.6.086.83 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-374-375

APPLICATION OF THE PRODUCT FROM THE LOW MUSHROOM BIOMASS IN THE PRODUCTION OF CANNED CONTAINING DEFROSTED VEGETABLE COMPONENTS

Yushina E.A., Bogush V.I., Novikova Zh.V., Sergeeva S.M., Lisovskii A.V.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Moscow State University of Food Production",
Moscow, Russia

115080, Moscow, Volokolamsk highway, 11

e-mail: Vladimir2001@yandex.ru

The use of biomass preparation micromycete *Mortierella alliaceae* in production technology sterilizable canned food using defrosted vegetable raw materials improves color stability and improves the consistency of the finished product.

Key words: defrosted plant components, micromycete *Mortierella alliaceae*, polyunsaturated fatty acids, chitosan, color stability

Use of the drug from biomass microscopic fungi *Mortierella alliaceae* improves reliability prevent cooking of defrosted vegetable components and color stability of the final product.

The method is implemented as follows. The dry biomass of micromycete *Mortierella alliaceae* is extracted with a non-polar extractant, for example, carbon dioxide or hexane, in a supercritical state. At this stage of extraction, the first extract is separated, which is further used in preparation. Next, the biomass is sequentially extracted with water, alkali, water, acid, water, alkali and water. The solid residue obtained after completion of all the extraction stages listed above is combined with the first extract to obtain a preparation which is introduced into the prepared filling liquid.

Vegetable raw materials frozen in whole or in pieces are defrosted. If there are other solid components in the prepared product, they are subjected to preparation and, if necessary, technological processing, characteristic of each specific type of raw material. Then the components are packaged in consumer packaging, which is sealed and sterilized. Heating of solid components during sterilization leads to thermal degradation of biopolymers, the depth of which determines their consistency and shape retention in the finished product.

At the same time, it should be noted that damage to the cells of plant materials leads to an increase in the availability of dyes, which increases the likelihood of a color change, especially of defrosted components. Empirically determined that Konsa moats, thus prepared, have a higher color stability.

As an example, canned meat "Pork with peas" is prepared using defrosted green peas and carrots in pieces, a preparation from the biomass of micromycete *Mortierella alliaceae*. The preparation was prepared using hexane as a non-polar extractant in experimental canned food and magnesium chloride in control canned food in the following ratio of components, parts by weight: Pork – 400; Animal Fat – 30; Peas – 28; Carrots – 28; Onion – 75; Salt -12; Ground black pepper - 0.12; Bay leaf - 0.1; Magnesium Chloride or Drug from biomass *Mortierella alliaceae* - 0.04; Water - 177.74. After sterilization, the pea and carrot grains retain their original shape in both consignments. The color of these components in the experimental batch of canned food is noticeably brighter than in the control, carrots turn brown to a lesser extent.

Thus, use of the drug from biomass micromycete *Mortierella alliaceae* improves the reliability of obtaining high quality products from defrosted vegetable raw materials like consistency, and on the color stability.

References

1. Eroshin V. The K., Dedyukina E. The G. Effect of lipids from *Mortierella hygrophila* on plant resistance to phytopathogens // *World J. of Mikrobiol. & Biotechnol.* 2002.-Vol.18.-P.165-167
2. Eroshin In. K., Dedyukhina e. R. and others. The study of the synthesis of arachidonic acid by fungi of the genus *Mortierella*: a microbiological method for the selection of producers of arachidonic acid // *Microbiology.* 1996.- T. 65, issue 1.- p. 31-36
3. *Conservation Technology: Textbook / T.F.K. Iseleva, V.A. Pomozova, E.S. Gorenkov - St. Petersburg.: Prospectus of Science, 2018. -- 416 p.*

УДК 579.676, 613.292 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-376-377

МИКРОБНЫЕ НУТРИПАРАФАРМАЦЕВТИКИ НА КОМПЛЕКСНОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Борисенко Е.Г., Родригес В.И., Зуев Р.А., Молиер А.

Московский Государственный университет пищевых производств, Москва, Россия
125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11.
e-mail: rzuev1996@mail.ru

Разработана технология получения нутрипарафармацевтика методом твердофазного культивирования на растительном пищевом сырье микробных ассоциаций из дрожжей и бактерий, выделенных из съедобных растительных и животных продуктов.

Ключевые слова: дрожжи, лактобактерии, микробиоценоз, нутрипарафармацевтики, твердофазная ферментация.

Оптимальное питание современного человека требует дополнительного потребления высокоценного белка, сбалансированного по содержанию незаменимых аминокислот. Дефицит этого белка для человека в масштабах планеты превышает 20 млн. т/год. В пищевой цепи высших животных и человека животный белок строится прежде всего из белка микробного, поэтому производство высокоценного нутрицевтика экономически наиболее реально с помощью микроорганизмов. Микробиоценоз ЖКТ играет огромную роль в гомеостазе макроорганизма, а в последние годы в литературе появляется все больше публикаций о прогрессирующем снижении количества микробной биомассы и даже видов микроорганизмов в микробиоценозе человека, причем наиболее свойственно это для населения экономически развитых стран. Снижение массы микробиоценоза ЖКТ в определенной степени связывают с ростом аутоиммунных, аллергических заболеваний и с увеличением агрессивности антибиотикорезистентных, патогенных и условно патогенных бактерий.

Медицинская промышленность РФ в небольших объемах уже производит препараты, предназначенные для коррекции нарушений микробиоценозов ЖКТ (про-, пре-, син- и симбиотики). К сожалению, эффективность этих материалов по их способности скорректировать кишечные микробиоценозы очень скромная.

Крупнотоннажная биотехнологическая промышленность СССР и РФ уже производила дрожжевые микробные нутрицевтики на базе гидролизатов целлюлозного сырья и на жидких парафинах нефти. Нутрицевтики на вторичном агропромышленном сырье с помощью дрожжей, растущих на не гидролизованном целлюлозосодержащем сырье, разработали и производили в лабораторных и полупроизводственных условиях в МГУПП, но в этих технологиях не было парафармацетического компонента, а разрушение промышленного животноводства страны привело к остановке работ по технологии производства и микробных нутрицевтиков для животных.

В проведенном исследовании была предпринята попытка разработать универсальные нутрипарафармацевтики на растительном пищевом сырье с помощью микробных ассоциаций из дрожжей и бактерий, выделенных из съедобных растительных и животных продуктов, прежде всего из молока животных и человека, а также из сквашенных овощей и фруктов.

В роли твердого съедобного субстрата выступали первичные и вторичные зерновые продукты: отруби пшеничные, зерно пшеницы дробленое, зерно пшеницы пророщенное дробленое. На измельченные зерновые субстраты вносили посевные культуры естественных изолятов дрожжей *Pichia guilliermondii* Яхрома 1 и бактерий, выделенных из натурального женского, коровьего и козьего молока, а также различных видов бактерий рода *Lactobacillus* в виде производственных заквасок ООО «Союзснаб».

При твердофазном культивировании удалось достичь роста дрожже-бактериальных ассоциаций на растительных субстратах: для дрожжей до 10^{10} КОЕ/г, а для лактобактерий 10^{10} - 10^{11} КОЕ/г.

Полученные при твердофазном выращивании дрожже-бактериальные комплексные культуры высушивали при температуре до 35°C. Эти сухие закваски, которые сами можно классифицировать как БАДы к пище, обогащенные микробным белком до его содержания 17-19% (т.е. на 20-25% больше, по сравнению с исходным зерновым ферментируемым материалом), смешивали с пульпой измельченных сахаристых субстратов (овощей и фруктов) в соотношении 1:1-1:2 и после кратковременной ферментации (10-12 часов) предлагали в качестве микробно-растительных десертов с живой микрофлорой типа пробиотиков или симбиотиков.

UDC 579.676, 613.292 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-376-377

MICROBIAL NUTRIPARAPHARMACEUTICALS IN AN INTEGRATED VEGETABLE EDIBLE RAW MATERIAL

Borisenko Y.G., Zuev R.A., Moliere A.

*Moscow state University of food production, Moscow, Russia 125080, Moscow, Volokolamsk highway, 11.
e-mail: rzuev1996@mail.ru*

The technology for obtaining nutriparafamaceuticals by solid-phase cultivation of microbial associations from yeast and bacteria isolated from edible plant and animal products on plant food raw materials has been developed.

Key words: yeast, lactobacillus, microbiocenosis, nutriparapharmaceuticals, solid state fermentation.

Optimal nutrition of a modern person requires additional consumption of high-value protein, balanced by the content of essential amino acids. The shortage of this protein for humans on a global scale exceeds 20 million tons / year. In the food chain of higher animals and humans, animal protein is built primarily from microbial protein, so the production of high-value nutraceuticals is most economically feasible with the help of microorganisms. Microbiocenosis of the gastrointestinal tract plays a huge role in the homeostasis of the macroorganism, and in recent years there are more and more publications in the literature about the progressive decrease in the number of microbial biomass and even types of microorganisms in the human microbiocenosis, and this is most typical for the population of economically developed countries. The decrease in the mass of the gastrointestinal microbiocenosis is to some extent associated with an increase in autoimmune and allergic diseases and with an increase in the aggressiveness of antibiotic-resistant, pathogenic and opportunistic bacteria.

The medical industry of the Russian Federation in small volumes already produces drugs designed to correct violations of microbiocenosis of the gastrointestinal tract (probiotics, prebiotics, sinbiotics and symbiotics). Unfortunately, the effectiveness of these materials in their ability to correct intestinal microbiocenoses is very modest.

The large-capacity biotechnological industry of the USSR and the Russian Federation already produced yeast microbial nutraceuticals based on hydrolysates of cellulose raw materials and on liquid paraffins of oil. Nutraceuticals on secondary agro-industrial raw materials using yeast growing on non-hydrolyzed cellulose-containing raw materials were developed and produced in laboratory and semi-production conditions in MGUPP, but these technologies did not have a parapharmaceutic component, and the destruction of the country's industrial livestock production led to a halt of work on the production technology and microbial nutraceuticals for animals.

The study attempted to develop universal nutriparapharmaceuticals based on plant food raw materials using microbial associations from yeast and bacteria isolated from edible plant and animal products, primarily from animal and human milk, as well as from fermented vegetables and fruits.

Primary and secondary grain products were used as a solid edible substrate: wheat bran, crushed wheat grain, and sprouted crushed wheat grain. Crops of natural isolates of the yeast *Pichia guilliermondii* Yakhroma 1 and bacteria isolated from natural female, cow and goat milk, as well as various types of bacteria of the genus *Lactobacillus* in the form of production ferments of Soyuznab LLC were applied to the crushed grain substrates.

With solid-phase cultivation, the growth of yeast-bacterial associations on plant substrates was achieved: for yeast up to 10^{10} CFU/g, and for lactobacillus 10^{10} - 10^{11} CFU/g.

The yeast-bacterial complex cultures obtained during solid-phase cultivation were dried at a temperature of up to 35°C. these dry ferments, which themselves can be classified as dietary Supplements, enriched with microbial protein to its content of 17-19% (i.e. 20-25% more than the original grain fermented material), were mixed with a pulp of crushed sugar substrates (vegetables and fruits) in a ratio of 1:1-1:2 and after short-term fermentation (10-12 hours) were offered as microbial-vegetable desserts with live microflora such as probiotics or symbiotics.

УДК 577:11 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-378-379

ЭКСПРЕССНЫЙ КОНТРОЛЬ АНТИБИОТИКА БАЦИТРАЦИНА В МОЛОКЕ: РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Бызова Н. А.¹, Серченя Т. С.², Вашкевич И. И.², Жердев А. В.¹, Свиридов О. В.², Дзантиев Б. Б.¹

¹ 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: nbyzova@inbi.ras.ru

² Институт биоорганической химии НАН Беларуси

220141 г. Минск, ул. Купревича, д. 5, корп. 2

Разработана иммунохроматографическая тест-система для выявления пептидного антибиотика бацитрацина в молоке. Определены ее аналитические параметры: визуальный и инструментальный пределы обнаружения – 100 и 1,0 нг/мл, рабочий диапазон количественного измерения – от 3 до 80 нг/мл, продолжительность анализа – 10 минут. Тест-система позволяет получать достоверную информацию о содержании бацитрацина в молоке без пробоподготовки. Проведена апробация тест-системы на 90 пробах молока, показана корреляция с результатами, получаемыми с использованием коммерческого набора для иммуноферментного анализа. Степень выявления бацитрацина в молоке составляла от 75 до 140%.

Ключевые слова: пептидные антибиотики, бацитрацин, иммунохроматография, наночастицы золота, безопасность пищевых продуктов

Нерациональное и избыточное использование биологически активных веществ для лечения и профилактики заболеваний сельскохозяйственных животных приводит к их накоплению в продуктах питания. Длительное использование в пищу продуктов животного происхождения, содержащих антибиотики, может вызывать неблагоприятные для здоровья последствия, аллергические реакции и дисбактериоз, способствовать распространению антибиотикорезистентных форм микроорганизмов. В связи с этим для многих классов антибиотиков их использование в животноводстве ограничивается законодательными требованиями к предельно допустимому содержанию в пищевой продукции. Однако эти нормативы по-прежнему часто превышаются, что в значительной степени обусловлено экономической заинтересованностью производителей в применении антибиотиков как стимуляторов роста животных.

Бацитрацин, циклический пептидный антибиотик, является одним из наиболее распространенных препаратов, используемых в качестве кормовой добавки, а также для профилактики и лечения инфекционных заболеваний животных. Использование бацитрацина в медицине ограничено наружным применением из-за выраженной токсичности.

В рамках разработки иммунохроматографической тест-системы для экспрессного выявления бацитрацина получены препараты наночастиц золота со средним диаметром 34 нм и их конъюгаты с кроличьими антителами против бацитрацина. Сопоставлена антигенсвязывающая способность конъюгатов разного состава. Охарактеризованы процессы формирования детектируемых комплексов в ходе иммунохроматографии с использованием различных мембранных носителей. Установлены условия нанесения иммунореагентов на мембраны и их концентрации, обеспечивающие минимальный предел обнаружения бацитрацина. Показана специфичность тест-системы – отсутствие перекрестных реакций по отношению к другим антибиотикам.

Проведена апробация разработанной тест-системы на 90 пробах молока с содержанием жира 3,5-6%. Показано, что пороги визуальной и приборной детекции бацитрацина составляют 100 и 1,0 нг/мл, а диапазон количественно определяемых концентраций – от 3 до 80 нг/мл, что соответствует контролируемым уровням этого антибиотика при оценке безопасности продуктов питания. Тест-система позволяет получать достоверную информацию о содержании бацитрацина в молоке без пробоподготовки. Точность определения уровня бацитрацина при фотометрической регистрации – 1,5-7,0%. Продолжительность анализа – 10 минут. Показана корреляция результатов, получаемых с помощью разработанной тест-системы и коммерческого набора для иммуноферментного анализа, традиционно используемого для определения бацитрацина.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-58-00038) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № X18P-060).

UDC 577:11 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-378-379

EXPRESS CONTROL OF ANTIBIOTIC BACITRACIN IN MILK: DEVELOPMENT AND TESTING OF AN IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEM

Byzova N. A.¹, Serchenya T. S.², Vashkevich I. I.², Zherdev A. V.¹, Sviridov O. V.², Dzantiev B. B.¹

¹ A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamental Foundations of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

119071, Moscow, Leninsky prospect, 33, building 2

e-mail: nbyzova@inbi.ras.ru

² Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk 220141, Republic of Belarus

The immunochromatographic test system was developed for rapid control of polypeptide antibiotic bacitracin in milk. Its analytical parameters were determined. Visual and instrumental detection limits are 100 and 1.0 ng/ml, working range of quantitative measurements – 3–80 ng/ml, time of the assay – 10 min. The test system allows obtaining reliable information about the content of bacitracin in milk without sample preparation. The test system was validated for 90 samples of milk; good correlation with the results obtained using a commercial enzyme immunoassay kit was shown. The degree of bacitracin revealing in milk ranged from 75 to 140%.

Key words: peptide antibiotics, bacitracin, immunochromatography, gold nanoparticles, food safety

Unreasonable and excessive use of biologically active substances for the treatment and prevention of animal diseases animals leads to their accumulation in food. Prolonged use of food stuffs of animal origin containing antibiotics can cause negative health effects, allergic reactions and disbacterioses, and contribute to the propagation of antibiotic-resistant microorganisms. In this regard, their use of many antibiotics in animal husbandry is limited by legislative demands for their maximum permissible content in food products. However, these requirements are still often exceeded, which is largely due to the economic interest of manufacturers in the use of antibiotics as stimulants for animal growth.

Bacitracin, a cyclic peptide antibiotic, is one of the most common drugs used as a feed additive, as well as for the prevention and treatment of infectious diseases of animals. The application of bacitracin in medicine is limited to external use due to its severe toxicity.

Within the development of an immunochromatographic test system for rapid detection of bacitracin, preparations of gold nanoparticles with an average diameter of 34 nm and their conjugates with rabbit antibodies against bacitracin were obtained. Antigen-binding ability of conjugates of different composition was compared. The formation of detectable complexes during immunochromatography at various membrane carriers has been characterized. The conditions for the application of immunoreagents to membranes and their concentrations, which provide the minimum detection limit of the assay, have been established. The specificity of the test system (i.e. the absence of cross-reactions) in relation to other antibiotics has been shown.

The developed test systems were validated on 90 milk samples with a fat content of 3.5-6%. It was shown that the thresholds for visual and instrumental detection of bacitracin are 100 and 1.0 ng/ml, and the range of quantitatively determined concentrations is 3-80 ng/ml, which corresponds to the controlled levels of this antibiotic in assessing food safety. The test system allows obtaining reliable information about the content of bacitracin in milk without sample preparation. The accuracy of determining the level of bacitracin with photometric registration is 1.5-7.0%. The duration of the analysis is 10 minutes. Good correlation of the results obtained using the developed test system and a commercial enzyme immunoassay kit, traditionally used to determine bacitracin, is shown.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project no. 18-58-00038, and the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research, project no. X18P-060.

УДК: 664-4, ББК: 36.94 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-380-382

РАЗРАБОТКА БЫСТРОГО И НЕДОРОГО НЕДЕСТРУКТИВНОГО АНАЛИТИЧЕСКОГО МЕТОДА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТОЯНИЯ СВЕЖЕСТИ НЕКОТОРЫХ ОСЕТРОВЫХ ВИДОВ РЫБ ОБРАБОТАННЫХ РАСТВОРОМ ПАСЛЕНА

Д.Д.Вилкова¹, М.А.Егоров², Е.И.Кондратенко³, Р.Каруи¹

¹ Университет Артуа, EA 7394, ИШВ-Институт Шарль Виоллетт, F-62300, Ланс, Франция, Франция, 62000, Аррас, Командан Дюмец, 41, e-mail: dariavilkova333@gmail.com, romdhane.karoui@univ-artois.fr, +33762203802

² Федеральное государственное учреждение высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств», Москва, Россия, e-mail: egorovs.mail@gmail.com

³ Астраханский государственный университет, Астрахань, 414056, Россия

Настоящее исследование демонстрирует потенциал фронтальной флуоресцентной спектроскопии в сочетании с хемометрическими инструментами в качестве быстрого и неразрушающегося метода для мониторинга уровня свежести осетровых.

Ключевые слова: осетр, свежесть, фронтальная флуоресцентная спектроскопия, паслен, хемометрия.

Согласно данным 2017 года, Россия заняла второе место в мире по производству и эксплуатации осетровой продукции (икра и мякоть рыбы), представляющей высокую коммерческую ценность [1]. Будучи скоропортящимся продуктом, свежесть осетровых является важным показателем его коммерческого успеха и товарности. После гибели рыбы происходит ряд сложных химических, биохимических и микробных процессов, что приводит к потере качества рыбы.

Чтобы сохранить качество рыбных продуктов и продлить срок их годности, могут применяться различные методы, такие как охлаждение, вакуумная упаковка и / или модифицированная атмосферная упаковка [2] и так далее. Сегодня осознание потребителями натуральной продукции привлекло значительное внимание исследователей, объясняющих растущую необходимость в применении природных антиоксидантов и противомикробных веществ для рыбы и рыбных продуктах вместо синтетических. В этом контексте недавние исследования сообщают о значительном ингибирующем воздействии хитозана на микробиологические и биохимические механизмы, связанные с порчей рыбы [3]. Экстракты черного паслена (*Solanum nigrum* L.) обладают высокой антиоксидантной, антибактериальной и фунгицидной активностью благодаря наличию флавоноидов и фенольных соединений, улучшающих качество рыбных продуктов во время хранения [4].

Цели данного исследования направлены на изучение потенциальных возможностей применения быстрого аналитического метода фронтальной флуоресцентной спектроскопией, в сочетании с хемометрическими инструментами для мониторинга уровня свежести русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*), стерляди (*Acipenser ruthenus*) и севрюги (*Acipenser stellatus*), хранящихся при 4 °С

В настоящем исследовании образцы осетровых были погружены в 1,5% раствор черного паслена, используемого в качестве биологически активного вещества. Образцы рыбы были извлечены из раствора через 30 мин и высушены в течение 1 ч при 4 °С. Затем каждый образец осетра был упакован в герметичные пакеты из полиамида / полиэтилена (PA / PE 90) при нормальных атмосферных условиях и запечатаны при помощи импульсного герметика. Все образцы хранили при 4 °С и анализировали на 0, 3, 6, 10, 13 и 17 день.

Спектры излучения рибофлавина (405-650 нм) и никотинамиддинуклеотида (NADH) (360-600 нм) с длиной волны возбуждения, установленной на 380 и 340 нм, соответственно, были получены на срезах осетровых. Максимальная интенсивность флуоресценции (FI) спектров рибофлавина была ~ 460-490 нм, которая изменялась в зависимости от времени хранения. Наблюдаемые пики можно отнести к разным стабильным продуктам флуоресцентного окисления; среди них продукты, образующиеся в результате реакции ненасыщенных альдегидов с белками и / или продуктом фоторазрушения рибофлавина [5]. Спектры NADH показали несколько пиков, расположенных ~ 380, 460 и 485 нм. Оказалось, что форма спектров излучения NADH коррелировала с состоянием свежести образцов. Фактически, уменьшение (~ 460 и 485 нм) и увеличение (~ 380 нм) FI были отмечены для образцов осетровых рыб во время хранения. Резкое уменьшение FI ~ 460 и 485 нм можно объяснить окислением NADH во время хранения, что приводит к превращению NADH в NAD⁺, изменяющему форму спектров флуоресценции NADH [5]. Таким образом, можно сделать вывод, что спектры NADH можно использовать в качестве отпечатков пальцев, позволяющих идентифицировать уровень свежести рыбы.

Для извлечения информации из наборов данных были применены анализ главных компонент (PCA), общие компоненты и анализ удельных весов (CCSWA). PCA, примененный отдельно к спектрам рибофлавина и NADH, позволил провести некоторую дифференциацию образцов в зависимости от времени их хранения. Поскольку спектры NADH и рибофлавина показали их способность различать образцы осетровых, совместный анализ этих двух таблиц данных был выполнен с использованием CCSWA. Карта сходства, определенная CC1 и CC3, позволила четко различить образцы осетровых в зависимости от времени их хранения. Образцы осетра обработанные раствором пасленом черного, показали уменьшенную интенсивность окисления липидов на протяжении всего периода хранения. Действительно, на 3 день значение перекиси составило 1,47 мэкв. / кг рыбы для образцов, обработанных пасленом, в то время как необработанные образцы, представленные в тот же день (3 день), составили 5,45 мэкв. / кг, что свидетельствует об эффективности раствора паслена для продления срока годности осетровых образцов.

На основании набора экспериментальных данных, полученных в данном исследовании, было обнаружено, что нормализованные спектры излучения NADH и рибофлавина можно использовать в качестве собственных зондов для оценки уровня свежести образцов осетровых. Кроме того, использование раствора паслена черного увеличивает срок годности образцов осетровых. Таким образом, фронтальная флуоресцентная спектроскопия может быть использована в качестве недорогого и быстрого метода для оценки состояния свежести осетровых.

Финансирование: Аспирант Д. Вилкова благодарит программу Вернадского за финансовую поддержку при выполнении исследований для подготовки Ph.D. диссертации во время ее пребывания в университете Артуа.

Литература

1. Bronzi P, Chebanov M., Michaels J. T., Wei Q., Rosenthal H., Gessner J. *Sturgeon meat and caviar production: Global update 2017 // Journal of Applied Ichthyology.* – 2019. – 35. – P. 257–266.
2. Mei J., Ma X., Xie J. *Review on natural preservatives for extending fish shelf life // Foods.* – 2019. – 8(10). – 23 p.
3. Ebadi Z., Khodanazary, A., Hosseini, S. M., & Zanguee, N. *The shelf life extension of refrigerated Nemipterus japonicus fillets by chitosan coating incorporated with propolis extract // International Journal of Biological Macromolecules.* – 2019. – 139. – P. 94–102.
4. Padmashree A., Sharma G. K., Semwal A. D., Mahesh C. *Antioxygenic Activity of Solanum nigrum L. Leaves in Sunflower Oil Model System and Its Thermal Stability // Food and Nutrition Sciences.* – 2014. – 05. –P. 1022–1029.
5. Boughattas F., Vilkova D., Kondratenko E., Karoui, R. *Targeted and untargeted techniques coupled with chemometric tools for the evaluation of sturgeon (Acipenser gueldenstaedtii) freshness during storage at 4 °C // Food Chemistry.* – 2020. – 312. – P. 1-9.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-380-382

DEVELOPMENT OF NON-DESTRUCTIVE RAPID AND LOW-COST ANALYTICAL TECHNIQUE FOR THE DETERMINATION OF THE FRESHNESS STATE OF STURGEON SPECIES IMMERSSED IN NIGHTSHADE SOLUTION

D.Vilkova¹, M.Egorov², E.Kondratenko³, R.Karoui¹

¹ Artois University, EA 7394, ICV-Institut Charles VIOLLETTE, F-62300, Lens, France, France, 62000, Arras, Rue du Commandant Dumetz, 41

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Moscow State University of Food Production, Moscow, Russia

³ Astrakhan State University, Astrakhan, 414056, Russia

The present study demonstrates the potential of front-face fluorescence spectroscopy coupled with chemometric tools as a rapid and non-destructive method to monitor the freshness level of sturgeon.

Key words: sturgeon, freshness, front-face fluorescence spectroscopy, nightshade, chemometry

According to 2017, Russia occurred the second place in the world in the production and exploitation of sturgeon products (caviar and fish flesh) that present high commercial value [1]. Being a perishable product, sturgeon's freshness is an important indicator of its commercial success and commodity. After the death of fish, a series of complicated chemical, biochemical and microbial processes occurred resulting in a loss of fish quality.

To preserve the quality of fish products and extend its shelf-life, different techniques can be applied, such as refrigeration, vacuum and/or modified atmosphere packaging [2], and so on. Today, consumers perceptions of food

naturalness have received significant attention from scholars explaining the increasing need for the application of natural antioxidants and antimicrobials in fish and fish products instead of the synthetic ones. In this context, recent studies have reported significant inhibitory effects of chitosan on the microbiological and biochemical mechanisms involved in fish spoilage [3]. Black nightshade (*Solanum nigrum L.*) extracts present high antioxidant, antibacterial and fungicidal activity due to the presence of flavonoids and phenolic compounds improving the quality of fish products during storage [4].

The current study aims to explore the potential use of a rapid analytical technique named front-face fluorescence spectroscopy coupled with chemometric tools for monitoring the freshness level of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*), sterlet (*Acipenser ruthenus*) and sevruga (*Acipenser stellatus*) kept at 4 °C.

In the present study, sturgeon samples were immersed in 1.5% solution of black nightshade, used as a bioactive substance. The fish samples were removed from the solution after 30 min and drained for 1 h at 4°C. Then each sturgeon sample was packed into air-proofed polyamide/polyethylene packs (PA/PE 90) under normal atmospheric conditions and heat-sealed using an impulse sealer. All the samples were stored at 4°C and were analyzed on day 0, 3, 6, 10, 13 and 17.

The emission spectra of riboflavin (405-650 nm) and nicotinamide dinucleotide (NADH) (360-600 nm) with excitation wavelength set at 380 and 340 nm, respectively were acquired on sturgeon slices. The maximum fluorescence intensity (FI) of riboflavin spectra was located ~460-490 nm that changed according to the storage time. The observed peaks could be ascribed to different stable fluorescent oxidation products; among them, the products formed by the reaction of unsaturated aldehydes with proteins and/or riboflavin photo breakdown product [5]. The NADH spectra exhibited several peaks located ~ 380, 460 and 485 nm. It appeared that the shape of NADH emission spectra was correlated with the freshness state of samples. In fact, a decrease (~460 and 485 nm) and an increase (~380 nm) in the FI were noted for sturgeon samples during storage. The sharp decrease in the FI ~460 and 485 nm could be ascribed to the oxidation of NADH throughout storage, leading to the transformation of NADH to NAD⁺, modifying the shape of the NADH fluorescence spectra [5]. Thus, it could be concluded that NADH spectra could be used as fingerprints allowing the identification of fish freshness level.

To extract information from the data sets, principal component analysis (PCA) and common components and specific weights analysis (CCSWA) were applied. The PCA applied, separately, to riboflavin and NADH spectra allowed some differentiation of samples according to their storage time. As the spectra of NADH and riboflavin showed their ability to discriminate sturgeon samples, a joint analysis of these two data tables was performed by using the CCSWA. The similarity map defined by the CC1 and CC3 allowed clear discrimination between sturgeon samples as a function of their storage time. The dipping of sturgeon samples with a black nightshade solution delayed the development of lipid oxidation throughout the whole storage period. Indeed, on day 3, peroxide value was 1.47 meqO₂/kg fish for samples dipped with nightshade, while the no treated samples presented on the same day (day 3) 5.45 meqO₂/kg, indicating the effectiveness of nightshade solution to prolong the shelf-life of sturgeon samples.

Based the set of experimental data explored in the present study, it was found that the normalized emission spectra of NADH and riboflavin could be used as intrinsic probes for the evaluation of the freshness level of sturgeon samples. In addition, the use of a black nightshade solution extends the shelf-life of sturgeon samples. Thereby, front-face fluorescence spectroscopy could be used as a low-cost and fast method for the assessment of the freshness state of sturgeon.

Grant: Mrs. D. Vilkoва is grateful to Vernadski program for its financial support of her Ph.D. during her stay at Artois University.

References

1. Bronzi P., Chebanov M., Michaels J. T., Wei Q., Rosenthal H., Gessner J. Sturgeon meat and caviar production: Global update 2017 // *Journal of Applied Ichthyology*. – 2019. – 35. – P. 257–266.
2. Mei J., Ma X., Xie J. Review on natural preservatives for extending fish shelf life // *Foods*. – 2019. – 8(10). – 23 p.
3. Ebadi Z., Khodanazary, A., Hosseini, S. M., & Zanguee, N. The shelf life extension of refrigerated *Nemipterus japonicus* fillets by chitosan coating incorporated with propolis extract // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – 139. – P. 94–102.
4. Padmashree A., Sharma G. K., Semwal A. D., Mahesh C. Antioxygenic Activity of *Solanum nigrum L.* Leaves in Sunflower Oil Model System and Its Thermal Stability // *Food and Nutrition Sciences*. – 2014. – 05. –P. 1022–1029.
5. Boughattas F., Vilkoва D., Kondratenko E., Karoui, R. Targeted and untargeted techniques coupled with chemometric tools for the evaluation of sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) freshness during storage at 4 °C // *Food Chemistry*. – 2020. – 312. – P. 1-9.

УДК: 637.5.072/616-0 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-383-386

ПРИНЦИП ИДЕНТИФИКАЦИИ ТКАНЕ- И ВИДОСПЕЦИФИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ БЕЛКОВО-ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ЖИВОТНЫХ

Вострикова Н. Л., Чернуха И. М., Хвостов Д. В

Федеральный научный центр Пищевых систем им. В.М. Горбатова Российской академии наук, 109316, Российская Федерация, 109316, Москва, ул. Талалихина, 26
e-mail: n.vostrikova@fnscps.ru

Разработана схема построения протеомных карт и спектров выявленных белков и пептидов мяса и мясной продукции (на примере вареных колбасных изделий) при помощи биоинформационной обработки данных, и сформирован программный комплекс – атлас «Протеомные карты мяса и мясных продуктов» в качестве основного инструмента подтверждения уникального наименования стандартизированной российской мясной продукции.

Ключевые слова: идентификация, видоспецифичность, протеомная карта, протеомика.

В базе ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им.В.М. Горбатова» РАН проведены работы по разработке научно-практической модели выявления и идентификации ткане- и видоспецифичных веществ белковой природы в мясной продукции, на основании которых разработаны инструменты для подтверждения аутентичности мясной продукции и паспорта продукции, выработанной по ГОСТ.

Несомненный научный интерес представляет потенциал применения протеомной стратегии как инструмента для изучения белкового профиля объектов растительного и животного происхождения; выявления биомаркеров технологических процессов, качественной и количественной идентификации состава сырья и готовых мясных и мясорастительных продуктов, изучению механизмов изменения протеома для направленного формирования заданных характеристик животного сырья.

В соответствии с целью работы объектами исследований служили:

- *m.L. Dorsi*: свинины, говядины, конины, верблюжатины;
- грудные мышцы птицы (курица, индейка);
- модельные фарши из *m.L. Dorsi* животных и грудных мышц птицы в сочетании 1:1;

Опытные партии мясной продукции изготавливали на ОАО «Губкинский мясокомбинат» и МПЗ «Сафа», а также на экспериментальном производстве Алматинского технологического университета (Республика Казахстан), в соответствии с ГОСТ Р 52196-2011 и ГОСТ 33673-2015, а также обирали из розничной сети (различных производителей), в том числе выработанные по ТУ.

В основу исследований был положен экстракционно-фракционный подход к проведению протеомных исследований, с дальнейшей масс-спектрометрической идентификацией по методологии Bottom-up и биоинформационной интерпретацией полученных результатов, характерных для мясной продукции [1-5].

В результате проведенных исследований по модификации классических методологий по фракционированию и идентификации состава мышечных белков сельскохозяйственных животных и птицы, были разработаны специальные подходы. Они отражают использование протеомных методов для анализа мышечных белков при изучении мясного сырья, выявление и идентификацию ткане- и видоспецифичных веществ белковой природы в мышечной ткани, позволившие заложить научно-практические основы создания системной протеомной стратегии идентификации белкового состава мясной продукции.

Схема построения протеомных карт белков и пептидов мяса и мясной продукции при помощи биоинформационной обработки данных представлена на рисунке 1.

Построение протеомных карт белков сырья и мясной продукции, основывается на комплексном применении отдельных монометодологий таких, как:

- электрофорез (1Д, 2Д) – получение белкового паттерна из образца
- времяпролетная масс-спектрометрия – получение спектра выявленных белков и пептидов из образца;
- биоинформационная обработка данных – сравнение аминокислотной последовательности белков с БД расшифрованных геномов аналогичных видов, идентификация по соответствующим транскриптам (при отсутствии информации в БД), для идентификации каждого белка из полученного паттерна;
- анализ и архивирование полученной информации.

Биоинформационная обработка данных применялась не только в качестве доказательной базы при идентификации белков и пептидов из образцов, но и для количественной идентификации выявленных фракций.

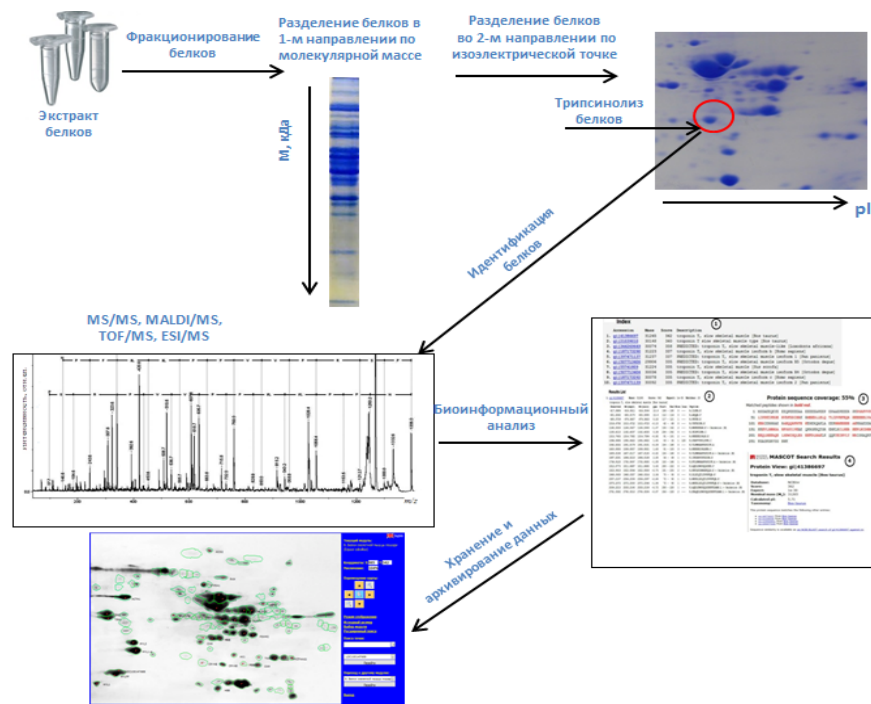


Рис. 1. Принципиальная схема построения ткане- и видоспецифичных веществ белково-пептидной природы мяса и мясной продукции.

Проведение биоинформационной интерпретации полученных результатов позволило сформулировать и значительно расширить подходы к идентификации и количественному определению белковых маркеров качества, функциональности и безопасности мясного сырья (выявления фальсификации, установление наличия аллергенов) в готовых мясных продуктах.

Литература

1. Chait B.T. Mass spectrometry: bottom-up or top-down? *Science*. 2006. Vol. 314 № 5796. P. 65–66. <https://doi.org/10.1126/science.1133987>
2. Zhang Y, Fonslow B.R., Shan B., et al. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem Rev*. 2014. Vol. 113 №4. P. 2343–2394. <https://doi.org/10.1021/cr3003533>
3. Yates J.R., Ruse C.I., Nakorchevsky A. *Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications*. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2009. Vol. 11. P. 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-061008-124934>
4. Ковалева М.А., Ковалев Л.И., Вострикова Н.Л., и др. Протеомное исследование мясного сырья, вареных колбас и функциональных мясных продуктов. *Современные проблемы науки и образования*. — 2013. — № 5. — 8 с.
5. Вострикова Н.Л., Чернуха И.М. Биоинформатика – инструмент интерпретации протеомных профилей белков мяса. *Теория и практика переработки мяса*. — 2017. . –Т. 2. №. 1. – С. 4-17. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2017-2-1-4-17>

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-383-386

THE PRINCIPLE OF IDENTIFICATION OF TISSUE- AND SPECIES-SPECIFIC SUBSTANCES OF PROTEIN-PEPTIDE NATURE IN MUSCLE TISSUE OF ANIMALS

Vostrikova N. L., Chernukha I. M., Khvostov D. V.

V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, 109316 Moscow, Russian Federation

e-mail: n.vostrikova@fncps.ru

A scheme was developed for constructing proteomic maps and spectra of identified proteins and peptides of meat and meat products (using cooked sausages as an example) using bioinformatics processing of data, and

a software package – the atlas “Proteomic maps of meat and meat products” was formed as the main tool for confirming the unique name of the standardized Russian meat products.

Key words: identification, species-specificity, proteomic map, proteomics.

In the base of the Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Center for Food Systems named after V.M. Gorbatov” RAS conducted work on the development of a scientific and practical model for identifying and identifying tissue and species-specific substances of protein nature in meat products, on the basis of which tools were developed to confirm the authenticity of meat products and product passports developed in accordance with GOST.

Of undoubted scientific interest is the potential of using the proteomic strategy as a tool for studying the protein profile of objects of plant and animal origin; identifying biomarkers of technological processes, qualitative and quantitative identification of the composition of raw materials and finished meat and meat and vegetable products, studying the mechanisms of proteome changes for the directed formation of desired characteristics of animal raw materials.

In accordance with the purpose of the research objects were:

- m.L. Dorsi: pork, beef, horsemeat, camel;
- pectoral muscles of the bird (chicken, turkey);
- mincemeat from m.L. Dorsi animal and pectoral muscles of the bird combined 1: 1;

Experimental batches of meat products were manufactured at OAO Gubkinsky Meat Processing Plant and MPZ Safa, as well as at the experimental production of Almaty Technological University (Republic of Kazakhstan), in accordance with GOST R 52196-2011 and GOST 33673-2015, and also fleeced from the retail network (various manufacturers), including those developed according to technical specifications.

The research was based on the extraction-fractional approach to proteomic research, with further mass spectrometric identification according to the Bottom-up methodology and bio-informational interpretation of the results obtained, characteristic for meat products [2-6].

As a result of studies on the modification of classical methodologies for fractionation and identification of the muscle proteins of farm animals and poultry, special approaches have been developed. They reflect the use of proteomic methods for the analysis of muscle proteins in the study of raw meat, the identification and identification of tissue and species-specific substances of a protein nature in muscle tissue, which laid the scientific and practical foundations for creating a systemic proteomic strategy for identifying the protein composition of meat products.

The scheme for constructing proteomic maps of proteins and peptides of meat and meat products using bioinformation processing of data is presented in Figure 1.

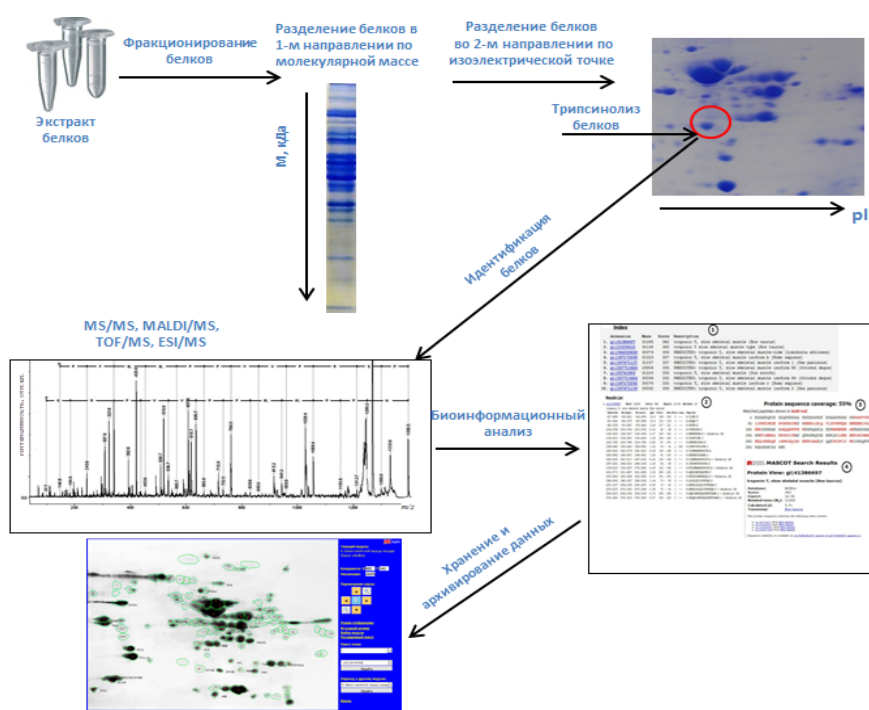


Fig. 1. Schematic diagram of the construction of tissue- and species-specific substances of the protein-peptide nature of meat and meat products.

The construction of proteomic maps of the proteins of raw materials and meat products is based on the integrated use of individual monomethodologies such as:

- electrophoresis (1D, 2D) - obtaining a protein pattern from a sample
- time-of-flight mass spectrometry - obtaining a spectrum of detected proteins and peptides from a sample;
- bioinformation processing of data - comparison of the amino acid sequence of proteins with databases of decrypted genomes of similar species, identification by appropriate transcripts (in the absence of information in the database), to identify each protein from the resulting pattern;
- analysis and archiving of the information received.

Bioinformation processing of the data was used not only as an evidence base for the identification of proteins and peptides from samples, but also for the quantitative identification of fractions identified.

Bioinformational interpretation of the results made it possible to formulate and significantly expand approaches to the identification and quantification of protein markers of the quality, functionality and safety of meat raw materials (detecting fraud, determining the presence of allergens) in finished meat products.

References

1. Chait B.T. Mass spectrometry: bottom-up or top-down? *Science*, 2006, 314 (5796), 65–66. <https://doi.org/10.1126/science.1133987>
2. Zhang Y., Fonslow B.R., Shan B., et al. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem Rev.*, 2014, 113 (4), 2343–2394. <https://doi.org/10.1021/cr3003533>
3. Yates J.R., Ruse C.I., Nakorchevsky A. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2009, 11, 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-061008-124934>
4. Kovaleva M. A., Kovalev L. I., Vostrikova N.L., et al. Proteomnoye issledovaniye myasnogo syr'ya, varenykh kolbas i funktsional'nykh myasnykh produktov Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya, 2013, (5), 8 (In Russian).
5. Vostrikova N.L., Chernukha I.M. Bioinformatics – instrument interpretation proteomic profiles of meat protein. *Theory and practice of meat processing*. 2017, 2(1), 4-17 (In Russian). <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2017-2-1-4-17>

УДК 57.042:577.13 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-386-388

ПИГМЕНТНЫЙ СОСТАВ ЗЕЛЁНОЙ ВОДОРОСЛИ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ НЕСКОЛЬКИХ ИНДУКТОРОВ НАКОПЛЕНИЯ АСТАКСАНТИНА

Вязов Е. В.¹, Гончарик Р. Г.¹, Куликов Е. А.², Селищева А. А.^{2,3}

¹ Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

220072, Беларусь, Минск, ул. Академическая, 27

e-mail: viazau@yahoo.com

Изучено содержание астаксантина, в том числе его моно- и диэфиров и фотосинтетических пигментов в клетках *H. pluvialis* штамма BVCE-H17 в условиях комбинации действия нескольких индукторов накопления астаксантина в течение продолжительного времени. Показана неэффективность одновременного внесения нескольких индукторов накопления астаксантина в среду культивирования на фоне действия света высокой интенсивности.

Ключевые слова: астаксантин, *Haematococcus pluvialis*, пигменты, ацетат натрия, хлорид натрия, свет высокой интенсивности.

Зелёная водоросль гематококк (*Haematococcus pluvialis*) является одним из наиболее перспективных источников астаксантина [1] – антиоксиданта, который может быть использован в качестве биологически активной добавки в пищу, а также в качестве кормовой добавки для сельскохозяйственных животных, в косметологии, фармацевтике. Клетки гематококка накапливают астаксантин при действии ряда стрессоров. Величина и динамика ответа на действие стрессора могут существенно зависеть от используемого штамма, а также от времени воздействия и базового состава среды культивирования.

Культуру *H. pluvialis* штамма BVCE-H17 (из биотехнологической коллекции Института биофизики и кле-

точной инженерии НАН Беларуси) на жидкой среде Рудика подращивали 4-5 дней при освещённости 1500 лк в режиме 14 ч света – 10 ч темноты при температуре в световом периоде 23 ± 2 °С. После этого в суспензию вносили добавки. Опытные варианты: “Контроль” - среда Рудика без добавок; “Ацетат 1” - вносили 1 г/л ацетата натрия; “Ацетат 2” - вносили 2 г/л ацетата натрия; “Ацетат 2 + Fe” - вносили 2 г/л ацетата натрия и 50 мМ FeSO₄; “Ацетат 1 + NaCl” - вносили 1 г/л ацетата натрия и 100 мМ NaCl. Все варианты далее выращивались при освещённости 9000 лк в течение 20 суток. Содержание пигментов в клетках гематококка определяли методом ВЭЖХ.

Для *H. pluvialis* штамма IBCE-H17 показана эффективная индукция накопления астаксантина, преимущественно в виде моноэфиров жирных кислот под светом высокой интенсивности при внесении в среду культивирования 1 или 2 г/л ацетата натрия. Параллельно этому в клетках *H. pluvialis* в вариантах «Ацетат 1», «Ацетат 2» и «Ацетат 2 + Fe» происходило снижение содержания хлорофиллов *a* и *b* (на 16-52% и на 31-56% соответственно), а также лютеина. Выявлен негативный эффект добавления в среду с ацетатом натрия двухвалентного железа на содержание как астаксантина, так фотосинтетических пигментов в клетках водоросли. Использование ацетата натрия совместно с хлоридом натрия не вызывало заметных изменений в содержании астаксантина по сравнению с применением одного ацетата натрия. Однако в данном случае средние значения содержания фотосинтетических пигментов (хлорофиллы *a* и *b*, неоксантин, лютеин) оказались, наоборот, выше. Полученные данные могут быть использованы в биотехнологическом процессе получения биомассы гематококка, обогащённой хозяйственно ценными соединениями.

Литература

Johnson E.A., Schroeder W.A. *Microbial carotenoids // Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology*. - 2006. - Vol. 53. - P. 119–178.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-386-388

PIGMENT COMPOSITION OF THE GREEN ALGA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* DURING ACTION OF MULTIPLE ASTAXANTHIN ACCUMULATION INDUCTORS

Viazau Y.V.¹, Goncharik R.G.¹, Kulikov E.A.², Selishcheva A.A.^{2,3}

¹State Scientific Institution «Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus», Minsk, Belarus

²National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, Russia

³M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia
220072, Belarus, Minsk, Akademicheskaya str., 27
e-mail: viazau@yahoo.com

The content of astaxanthin, including its mono- and diesters, and photosynthetic pigments, was studied in cells of *H. pluvialis* strain IBCE-H17 under combined prolonged action of several inducers of astaxanthin accumulation. The ineffectiveness of the simultaneous introduction of several inducers of astaxanthin accumulation in the culture medium during high-intensity light treatment was shown.

Key words: astaxanthin, *Haematococcus pluvialis*, pigments, sodium acetate, sodium chloride, high-intensity light.

Haematococcus green alga (*Haematococcus pluvialis*) is one of the most promising sources of astaxanthin [1] - an antioxidant that can be used as a biologically active food supplement, as well as a feed additive for farm animals, in cosmetics and pharmaceuticals. *Haematococcus* cells accumulate astaxanthin when exposed to a number of stressors. The magnitude and dynamics of the response to the action of the stressor can significantly depend on the strain used, as well as on the exposure time and the basic composition of the culture medium.

A culture of *H. pluvialis* strain IBCE-H17 (from the biotechnological collection of the Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus) was cultivated for 4-5 days on Rudic liquid medium with an illumination of 1500 lux and with 14 hour photoperiod at a temperature (in the photoperiod) of 23 ± 2 °С. After that, additives were added to the suspension. Experimental variants: “Control” - Rudic medium without additives; “Acetate 1” - 1 g/l of sodium acetate was added; “Acetate 2” - 2 g/l of sodium acetate was added; “Acetate 2 + Fe” - 2 g/l sodium acetate and 50 мМ FeSO₄ were added; “Acetate 1 + NaCl” - 1 g/l of sodium acetate and 100 мМ NaCl were added. All variants were further grown under illumination of 9000 lux for 20 days. The pigment content in *haematococcus* cells was determined by HPLC.

Effective induction of astaxanthin accumulation was shown for *H. pluvialis* strain IBCE-H17, mainly in the form of fatty acid monoesters, under high-intensity light when 1 or 2 g/l sodium acetate was added to the culture medium. Parallel to this, in *H. pluvialis* cells of "Acetate 1", "Acetate 2" and "Acetate 2 + Fe" variants the content of chlorophylls *a* and *b* decreased (by 16-52% and by 31-56%, respectively), as well as did lutein content. The negative effect of adding ferrous iron to the medium with sodium acetate on the content of both astaxanthin and photosynthetic pigments in algae cells was revealed. The use of sodium acetate in conjunction with sodium chloride did not cause noticeable changes in the content of astaxanthin compared to the use of sodium acetate alone. However, in this case, the average values of the content of photosynthetic pigments (chlorophylls *a* and *b*, neoxanthin, lutein) were, on the contrary, higher. The obtained data can be used in the biotechnological process of obtaining haematococcus biomass enriched with economically valuable compounds.

References

Johnson E.A., Schroeder W.A. *Microbial carotenoids // Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology*. - 2006. - Vol. 53. - P. 119–178.

УДК 663.18, 579.674 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-388-389

ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ СТАБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ХРАНЕНИИ

Галуза О.А.¹, Николаев Ю.А.², Уланова Р.В.², Шакир И.В.¹, Хрептугова А.Н.³

¹ ФГБОУ ВПО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», 125480, г. Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20, корп. 1

² ФИЦ Биотехнологии РАН, РФ, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119991, г. Москва, ул. Ленинские Горы, д. 1

e-mail: olesya_galuza@mail.ru

Исследованы различные способы стабилизации клеток молочнокислой бактерии *Enterococcus faecium* при длительном хранении. Показано, что длительному выживанию *E. faecium* способствуют добавление Энтеросгеля, Полисорба, использование среды LB, а также их иммобилизация в гуминово-силанольный гель.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, *E. faecium*, увеличение срока хранения, гуминово-силанольные гели, пробиотики, кисломолочные продукты, сохранение жизнеспособных клеток.

Молочнокислые бактерии широко используются при изготовлении молочнокислых продуктов и различных биопрепаратов, незаменимых для общего, диетического и лечебного питания [1]. Однако бактерии быстро отмирают, поэтому сроки хранения продукции с молочнокислыми организмами составляют не более 2-4 недель [2]. Лиофилизация и криоконсервирование являются наиболее эффективными в хранении бактериальных клеток, но их применение ограничено из-за высокой стоимости [3]. Актуальным является поиск способов сохранения жизнеспособности клеток молочнокислых бактерий при хранении.

Объектом исследования были молочнокислые бактерии *Enterococcus faecium* (Orla-Jensen, 1919). Культуры выращивали на жидких питательных средах: молоко, LB Miller и др. Культивировали бактерий на молоке в присутствии сорбентов: Полисорб (высокодисперсный кремнезем) – 0,33 г/л, гранулы полимолочной кислоты – 0,2 г/л, Энтеросгель (гидрогель метилкремниевой кислоты) – 0,4 г/л. Иммобилизацию клеток культуры осуществляли в гуминово-силанольный гель на основе гуматов Паухумус и Байкал [4]. Титр жизнеспособных клеток определяли микрометодом, а их метаболическую активность оценивали по накоплению CO₂.

Результаты. Показано, что максимальный титр КОЕ культуры *E. faecium* на молоке составляет 6-9x10⁸ КОЕ/мл, а на LB – 3-4x10⁷ КОЕ/мл. Однако при длительном хранении титр КОЕ на среде LB сохранялся практически неизменным на протяжении 2 мес., в то время как при хранении на молоке в течение 1 мес этот показатель снижался до 2-3x10⁷ КОЕ/мл, т.е. на 1 порядок. Влияние стабилизирующих добавок исследовали на культурах лактококка, выращенных на молоке.

При иммобилизации стационарной культуры *E. faecium* в силанольно-гуминовый гель и последующем хранении в течение 3х недель скорость отмирания клеток была ниже, чем в контроле, что обусловило превышение титра КОЕ в опытной культуре над контрольной в 30-60 раз.

При культивировании клеток в присутствии сорбентов лучший эффект стабилизации показали Энтеросгель и Полисорб, что определяли по скорости метаболизма, которая была в 2 раза выше, чем в контроле.

Литература

1. Бельмер С.В. Кисломолочные продукты: от истории к современности // российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2019. – Т. 64, №. 6. – С. 119-125.
2. Николаев Ю.А., Шевченко Е.Ф., Эль-Регистан Г.И. Способы повышения жизнеспособности молочнокислых микроорганизмов // Микробиология. – 2019. – Т. 88, №. 5. – С. 1-6.
3. Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – №. 5. – С. 3-5.
4. Перминова И.В., Пономаренко С.А., Воликов А.Б. Гуминовые силанольные производные: метод получения и способ приенения // Патент России № 2530024. 2014. Бюл. № 2.

UDC 663.18, 579.674 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-388-389

INVESTIGATION OF VARIOUS WAYS TO STABILIZE LACTIC ACID BACTERIA CELLS DURING LONG-TERM STORAGE

Galuzha O. A.¹, Nikolaev Yu. A.², Ulanova R. V.², Shakir I. V.¹, Khreptugova A. N.³

¹ D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 125480, Moscow, Geroyev Panfilovtsev str., building 1

² FITS Biotechnology, Russian Academy of Sciences, 119071, Moscow, Leninsky Prospect, 33, Building 2

³ Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Leninskie Gory str., building 1

e-mail: olesya_galuzha@mail.ru

Various methods of stabilizing the cells of the lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* during long-term storage were studied. It is shown that the long-term survival of *E. faecium* is promoted by the addition of Enterogel, Polysorb, the use of LB substratum, as well as their immobilization in humic-silanol gel.

Key words: lactic acid bacteria, *E. faecium*, increased shelf life, humic-silanol gels, probiotics, fermented milk products, preservation of viable cells.

Lactic acid bacteria are widely used in the manufacture of lactic acid products and various biological products that are indispensable for general, dietary and therapeutic nutrition [1]. However, bacteria die off quickly, so the shelf life of products with lactic acid organisms is no more than 2-4 weeks [2]. Lyophilization and cryopreservation are most effective in storing bacterial cells, but their use is limited due to their high cost [3]. It is relevant to find ways to preserve the viability of lactic acid bacteria cells during storage.

The object of the study was the lactic acid bacteria *Enterococcus faecium* (Orla-Jensen, 1919). The cultures were grown on liquid nutrient medium: milk, LB Miller, etc. Bacteria were cultivated on milk in the presence of sorbents: Polysorb (highly dispersed silica) - 0.33 g / L, polylactic acid granules - 0.2 g / L, Enterogel (methylsilicon hydrogel acid) - 0.4 g / l. The immobilization of culture cells was carried out in a humic-silanol gel based on PowHumus and Baikal humates [4]. The titer of viable cells was determined by the micromethod, and their metabolic activity was assessed by the accumulation of CO₂.

Results. It has been shown that the maximum CFU titer of *E. faecium* culture on milk is 6-9x10⁸ CFU / ml, and on LB - 3-4x10⁷ CFU / ml. However, during long-term storage, the CFU titer on LB medium remained practically unchanged for 2 months, while during storage in milk for 1 month, this indicator decreased to 2-3x10⁷ CFU / ml, i.e. by 1 order. The effect of stabilizing additives was studied on lactococcus cultures grown in milk.

During immobilization of a stationary culture of *E. faecium* in a silanol-humic gel and subsequent storage for 3 weeks, the rate of cell death was lower than in the control, which caused the CFU titer in the experimental culture to exceed the control by 30-60 times.

When cells were cultured in the presence of sorbents, Enterogel and Polysorb showed the best stabilization effect, which was determined by the metabolic rate, which was 2 times higher than in the control.

References

1. Belmer S.V. Fermented milk products: from history to the present // Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics. 2019. Vol.64. № 6. P. 119-125.
2. Nikolaev Yu.A., Shevchenko E.F., El-Registan G.I. Methods for increasing the viability of lactic acid microorganisms // Microbiology. 2019. Vol. 88. №. 5. P. 1-6.
3. Gracheva I.V., Osin A.V. Mechanisms of damage to bacteria during lyophilization and the protective effect of protective environments // Problems of dangerous infections. 2016. №. 5. P. 3-5.
4. Perminova I.V., Ponomarenko S.A., Volikov A.B. Humic silanol derivatives: method of preparation and method of application // Patent of Russia № 2530024. 2014. Bull. №. 2.

УДК 579.66 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-390-391

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА АЦЕТОИНА У БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

Гераскина Н.В., Федорова Е.Н., Киверо А.Д., Стойнова Н.В.

Акционерное общество «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика», Москва, Россия
117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1, к.1
e-mail: Natalia_Geraskina@agri.ru

Были исследованы некоторые особенности биосинтеза ацетоина у представителей *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens*.

Ключевые слова: ацетоин, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, ферментация.

Ацетоин (3-гидрокси-2-бутанон) является важным ароматическим соединением, широко распространенным в молочных продуктах и некоторых фруктах [1]. Благодаря своему уникальному вкусу масла, его можно использовать в качестве усилителя вкуса для масла или маргарина, сыра, кофе, пива, вина и орехов. Ацетоин также служит как базовое вещество, широко применяемое во многих отраслях промышленности. Также было показано, что ацетоин является одним из летучих органических соединений, выделяемым почвенными микроорганизмами, стимулирующими рост растений (PGPR-бактериями), и способствует росту модельных растений [2,3]. Ацетоин выделяется многими микроорганизмами, для которых характерно 2,3-бутандиоловое брожение.

Производство ацетоина для промышленных целей может быть достигнуто путем микробной ферментации, ферментативной конверсии и химического синтеза из диацетила или бутанола. По сравнению с химическим синтезом и ферментативной конверсией микробная ферментация имеет много преимуществ: недорогое сырье, меньшее загрязнение окружающей среды, высокая чистота продуктов и мягкие условия реакции. В данной работе была изучена продукция ацетоина штаммами *Bacillus*, микроорганизмами, перспективными с точки зрения использования в биотехнологии.

Были оптимизированы условия культивирования для нескольких штаммов *Bacillus*: для штамма *B. subtilis* 9338; для штамма *B. subtilis* 168 и для штаммов *B. amyloliquefaciens* FZB42, A50, BA1, NG342. Накопление ацетоина измерялось с помощью улучшенного метода UPLC [4]. Штамм *B. amyloliquefaciens* NG342, продуцирующий более 20 г/л ацетоина, был отобран для дальнейшей модификации. С целью усиления экспрессии ключевых ферментов биосинтеза ацетоина, α -ацетолактатсинтазы и α -ацетолактатдекарбоксилазы, регуляторная область соответствующих генов была модифицирована для улучшения трансляции. Это привело к (i) 12-кратному увеличению удельной активности α -ацетолактатсинтазы, дифференциально измеренной с помощью специально разработанного протокола, позволяющего исследователям различать каталитическую α -ацетолактатсинтазу (AlsS) и биосинтетическую ацетогидроксикислотную синтазу (IlvBH); (ii) небольшому увеличению накопления аминокислот с разветвленной цепью (BCAA), биосинтез которых тесно связан с биосинтезом ацетоина. Но значительного улучшения продукции ацетоина при этом не наблюдалось, по-видимому, из-за низкого сродства AlsS к пирувату.

Для того, чтобы улучшить конверсию углерода в ацетоин, в клетках был заблокирован один из путей брожения, альтернативных 2,3-бутандиоловому, а именно, преобразование пирувата в лактат. В результате усиления экспрессии ключевых биосинтетических ферментов и блокирования лактатдегидрогеназы накопление ацетоина увеличилось на 15%. Кроме того, было исследовано влияние условий аэрации и добавления органических кислот на накопление ацетоина; эти условия могут играть существенную роль, учитывая их участие в регуляции основных ферментов биосинтеза ацетоина и его дальнейшей конверсии в 2,3-бутандиол.

Литература

- Xu H., Jia S., Liu J. Development of a mutant strain of *Bacillus subtilis* showing enhanced production of acetoin // African Journal of Biotechnology. Academic Journals (Kenya), 2011. Vol. 10, № 5. P. 779–799.
- Ryu C.-M. et al. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. // Plant Physiol. 2004. Vol. 134, № 3. P. 1017–1026.
- Ryu C.-M. et al. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2003. Vol. 100, № 8. P. 4927–4932.
- Fedorova E. et al. HPLC and UPLC analyses of acetoin in bacterial culture fluid // Acta Chromatographica. Akadémiai Kiadó, 2015. Vol. 27, № 4. P. 613–622.

UDC 579.66 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-390-391

SOME FEATURES OF AN ACETOIN BIOSYNTHESIS BY BACTERIA FROM THE GENUS *BACILLUS*

Geraskina N.V., Fedorova E.N., Kivero A.D., Stoyanova N.V.

Joint-Stock Company "Ajinomoto Genetika Research Institute", Moscow, Russia
1st Dorozhny proezd, 1-1, Moscow 117545, Russia
e-mail: Natalia_Geraskina@agri.ru

Several features of an acetoin biosynthesis in *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* were investigated.

Key words: acetoin, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, fermentation

Acetoin (3-hydroxy-2-butanone) is an important flavor compound, widely existing in dairy products and some fruits [1]. Because of its unique butter flavor, it can be used as flavor enhancer of butter, cheese, coffee, beer, wine and nut. Acetoin also serves as a platform compound widely applied in many industries. Also, acetoin has been showed as one of the volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR, and promotes growth of model plants [2,3]. Acetoin is excreted by many microorganisms characterized by the 2,3-butanediol type of fermentation.

Production of acetoin in industry can be achieved by microbial fermentation, enzymatic conversion and chemical synthesis from diacetyl or butanol. Compared with the chemical method and enzymatic conversion, microbial fermentation has many advantages: inexpensive raw materials, less environmental pollution, high purity of products, and mild reaction conditions. So, acetoin production by promising biotechnological microorganisms, *Bacillus* strains, was studied.

Cultivation conditions for several *Bacillus* strains, *B. mucilaginosus* strain 9338; *B. subtilis* strain 168 and *B. amyloliquefaciens* strains FZB42, A50, BA1, NG342, were optimized, and acetoin accumulation was measured by the improved UPLC method [4]. *B. amyloliquefaciens* strain NG342 producing more than 20 g/L of acetoin was selected for further breeding. To enhance expression of the key enzymes of acetoin biosynthesis, α -acetolactate synthase and α -acetolactate decarboxylase, regulatory region of corresponding genes was modified to improve translation. This results in (i) 12-fold increase in specific activity of α -acetolactate synthase, which was differentially measured by specially developed protocol which allowed us to distinguish catabolic α -acetolactate synthase, AlsS, and biosynthetic acetohydroxy-acid synthase, IlvBH; (ii) slight increase in branched-chain amino acids, BCAA, accumulation, which biosynthesis is closely related to the biosynthesis of acetoin. But no significant improvement in acetoin production was detected presumably due to the low affinity of AlsS to pyruvate.

To improve conversion of carbon source into acetoin, the pyruvate conversion to lactate, one of the fermentation pathways alternative to 2,3-butanediol fermentation, was blocked. As a result of enhancement of the both expression of the key biosynthetic enzymes and lactate dehydrogenase disruption, 15% higher acetoin accumulation was detected. Moreover, considering tight regulation of the key enzymes of acetoin biosynthesis and its further conversion into to 2,3-butanediol, influence of aeration conditions and organic acids addition on acetoin accumulation were investigated.

References

1. Xu H., Jia S., Liu J. Development of a mutant strain of *Bacillus subtilis* showing enhanced production of acetoin // *African Journal of Biotechnology. Academic Journals (Kenya)*, 2011. Vol. 10, № 5. P. 779–799.
2. Ryu C.-M. et al. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. // *Plant Physiol.* 2004. Vol. 134, № 3. P. 1017–1026.
3. Ryu C.-M. et al. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003. Vol. 100, № 8. P. 4927–4932.
4. Fedorova E. et al. HPLC and UPLC analyses of acetoin in bacterial culture fluid // *Acta Chromatographica. Akadémiai Kiadó*, 2015. Vol. 27, № 4. P. 613–622.

УДК 579.676 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-392-394

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ ГРЕЧИХИ НА BIOTEХНОЛОГИЧЕСКИ ЦЕННЫЕ СВОЙСТВА *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*

Гребенщикова А. В., Иркитова А. Н., Дудник Д. Е.

Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия
656049, Барнаул, проспект Ленина, дом 61
e-mail: gelishka96@mail.ru

Изучено влияние экстрактов обжаренных и пророщенных зерен гречихи на биотехнологически ценные свойства *Lactobacillus acidophilus*. В определенных концентрациях данные пребиотики стимулируют рост и увеличение численности микроорганизма и придают ацидофильной закваске мягкий кисломолочный вкус.

Ключевые слова: *Lactobacillus acidophilus*; экстракты; зерна гречихи; пробиотики; пребиотики; биотехнология.

Одной из наиболее развитых биотехнологических отраслей пищевой промышленности является производство кисломолочных продуктов-пробиотиков [1]. В последние годы активно ведутся работы по подбору пребиотического компонента, усиливающего эффективность микроорганизмов [2].

Целью нашего исследования было изучить влияние экстрактов зерен гречихи на биотехнологически ценные свойства *Lactobacillus acidophilus*.

Объект исследования – штамм *L. acidophilus* В-2515 из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ). В ходе работы экстракты обжаренных и пророщенных зерен гречихи, полученные методом мацерации, вносили в молоко перед ростом микроорганизма в концентрациях 0,1, 0,3 и 0,5 %-в от общего объема. Для каждой из проб определяли биотехнологически ценные показатели.

В таблице 1 представлены результаты проведенного исследования.

Таблица 1. Влияние экстрактов гречихи на свойства штамма *L. acidophilus* В-2515

| Содержание экстракта гречихи, % | Активная кислотность, ед. рН | | | Титруемая кислотность, Т | | | Численность, КОЕ/см ³ | | |
|------------------------------------|------------------------------|---------------|---------------|--------------------------|------------------|------------------|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 18 часов | 7 суток | 14 суток | 18 часов | 7 суток | 14 суток | 18 часов | 7 суток | 14 суток |
| 0 (контроль) | 3,82± 0,02 | 3,91± 0,21 | 3,82± 0,05 | 248,23± 11,41 | 250,56± 12,99 | 245,73± 13,30 | 3,09× 10 ⁷ | 5,30× 10 ⁷ | 1,77× 10 ⁷ |
| Экстракт обжаренных зерен гречихи | | | | | | | | | |
| 0,1 | 3,82± 0,01 | 3,87± 0,14 | 3,83± 0,05 | 244,23± 12,80 | 252,90± 16,96 | 242,73± 9,30 | 2,32× 10 ⁷ | 1,00× 10 ⁶ | 1,10× 10 ⁶ |
| 0,3 | 3,80± 0,02 | 3,85± 0,17 | 3,84± 0,08 | 247,57± 14,82 | 250,57± 16,06 | 242,07± 15,35 | 3,15× 10 ⁷ | 2,90× 10 ⁷ | 1,10× 10 ⁷ |
| 0,5 | 3,78± 0,03 | 3,84± 0,02 | 3,83± 0,09 | 255,90± 13,31 | 254,23± 14,40 | 243,08± 11,99 | 2,53× 10 ⁸ | 1,00× 10 ⁸ | 2,10× 10 ⁸ |
| Экстракт пророщенных зерен гречихи | | | | | | | | | |
| 0,1 | 3,84± 0,09 | 3,79± 0,04 | 3,99± 0,08 | 242,83± 20,60 | 247,30± 11,10 | 242,97± 11,10 | 2,52× 10 ⁸ | 1,19× 10 ⁷ | 2,25× 10 ⁷ |
| 0,3 | 3,84± 0,08 | 3,81± 0,03 | 3,97± 0,03 | 251,84± 22,60 | 246,30± 13,11 | 250,64± 18,59 | 2,27× 10 ⁷ | 1,00× 10 ⁶ | 3,00× 10 ⁷ |
| 0,5 | 3,82± 0,09 | 3,80± 0,04 | 3,97± 0,20 | 243,63± 12,42 | 257,63± 12,60 | 243,64± 8,59 | 4,13× 10 ⁷ | 5,03× 10 ⁷ | 1,00× 10 ⁵ |

Экстракт обжаренных зерен гречихи в концентрации 0,5 % стабильно при хранении стимулировал увеличение численности *L. acidophilus* на порядок. При добавлении экстракта пророщенных зерен гречихи в концентрации 0,1 % увеличение КОЕ/см³ происходило после 18 часов роста, а при хранении не отмечалось никакого эффекта. Кроме того, данный экстракт в повышенной концентрации вызывал обратный эффект и нарушал плотность сгустка. Активная и титруемая кислотности в опыте и контроле значительно не варьировали, зато сброженное молоко с гречихой имело более мягкий кисломолочный вкус без постороннего привкуса.

Экстракты из зерен гречихи положительно влияют на биотехнологически ценные характеристики *L. acidophilus*. Поэтому данные пребиотические компоненты могут рекомендоваться для производства ацидофильной закваски.

Литература

1. Петухова Е. В., Крыницкая А. Ю. Перспективность использования микрокапсулированных пробиотических культур в пищевой промышленности // Вестник Казанского технологического университета. – 2014. – № 22. – С. 257-260.
2. Abdollahzadeh S. M., Zahedani M. R., Rahmdel S., Hemmati F., Mazloomi, S. M. Development of *Lactobacillus acidophilus*-fermented milk fortified with date extract// LWT. 2018. Vol. 98. P. 577-582.

UDC 579.676 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-392-394

EFFECT OF BUCKWHEAT EXTRACTS ON VALUABLE BIOTECHNOLOGICAL PROPERTIES OF *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*

Grebenshchikova A. V., Irkitova A. N., Dudnik D. E

Altai State University, Barnaul, the Russian Federation
656049, Barnaul, pr. Lenina 61
e-mail: gelishka96@mail.ru

The effect of roasted and sprouted buckwheat grains extracts on the valuable biotechnological properties of *Lactobacillus acidophilus* has been studied. These prebiotics stimulate the growth and increase the number of microorganisms in certain concentrations; give the acidophilic starter a soft sour-milk taste.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*; extracts; buckwheat grains; probiotics; prebiotics; biotechnology.

The production of fermented milk probiotic products is one of the most developed biotechnological branches of the food industry [1]. Studies on the selection of a prebiotic component that enhances the effectiveness of microorganisms have been actively conducted in recent years [2].

The aim of our study was to study the effect of buckwheat extracts on valuable biotechnological properties of *Lactobacillus acidophilus*.

The studied strain is *L. acidophilus* B-2515 strain from Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM). Extracts of roasted and sprouted buckwheat grains obtained by maceration were added to milk before the growth of the microorganism in concentrations of 0.1, 0.3 and 0.5% of the total volume. Valuable biotechnological characteristics were determined for each of the samples.

The results of the study are presented in table 1.

Table 1. The effect of buckwheat extracts on the properties of *L. acidophilus* B-2515 strain

| Buckwheat extract content, % | Active acidity (M ± m, pH) | | | Titratable acidity (M ± m, °T) | | | Cell number (CFU /cm ³) | | |
|-----------------------------------|----------------------------|---------------|---------------|--------------------------------|------------------|------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 18 hours | 7 days | 14 days | 18 hours | 7 days | 14 days | 18 hours | 7 days | 14 days |
| 0 (control) | 3,82± 0,02 | 3,91± 0,21 | 3,82± 0,05 | 248,23± 11,41 | 250,56± 12,99 | 245,73± 13,30 | 3,09× 10 ⁷ | 5,30× 10 ⁷ | 1,77× 10 ⁷ |
| Roasted buckwheat grains extract | | | | | | | | | |
| 0,1 | 3,82± 0,01 | 3,87± 0,14 | 3,83± 0,05 | 244,23± 12,80 | 252,90± 16,96 | 242,73± 9,30 | 2,32× 10 ⁷ | 1,00× 10 ⁶ | 1,10× 10 ⁶ |
| 0,3 | 3,80± 0,02 | 3,85± 0,17 | 3,84± 0,08 | 247,57± 14,82 | 250,57± 16,06 | 242,07± 15,35 | 3,15× 10 ⁷ | 2,90× 10 ⁷ | 1,10× 10 ⁷ |
| 0,5 | 3,78± 0,03 | 3,84± 0,02 | 3,83± 0,09 | 255,90± 13,31 | 254,23± 14,40 | 243,08± 11,99 | 2,53× 10 ⁸ | 1,00× 10 ⁸ | 2,10× 10 ⁸ |
| Sprouted buckwheat grains extract | | | | | | | | | |
| 0,1 | 3,84± 0,09 | 3,79± 0,04 | 3,99± 0,08 | 242,83± 20,60 | 247,30± 11,10 | 242,97± 11,10 | 2,52× 10 ⁸ | 1,19× 10 ⁷ | 2,25× 10 ⁷ |
| 0,3 | 3,84± 0,08 | 3,81± 0,03 | 3,97± 0,03 | 251,84± 22,60 | 246,30± 13,11 | 250,64± 18,59 | 2,27× 10 ⁷ | 1,00× 10 ⁶ | 3,00× 10 ⁷ |
| 0,5 | 3,82± 0,09 | 3,80± 0,04 | 3,97± 0,20 | 243,63± 12,42 | 257,63± 12,60 | 243,64± 8,59 | 4,13× 10 ⁷ | 5,03× 10 ⁷ | 1,00× 10 ⁵ |

An extract of roasted buckwheat grains at a concentration of 0.5% stably during storage stimulated an increase the CFU (colony-forming unit) number of *L. acidophilus* by an order. Extract of sprouted buckwheat grains in a concentration of 0.1% increased CFU/cm³ only after culturing for 18 hours, no effect during storage was noted. In addition, this extract in high concentration caused the opposite effect and disturbed the density of the clot. The active and titratable acidity in the experiment and control were did not vary significantly, but the fermented milk with buckwheat had a milder sour-milk taste without an extraneous taste.

Extracts of buckwheat grains positively affect the valuable biotechnological characteristics of *L. acidophilus*. Therefore, these prebiotic components can be recommended for the production of acidophilic starter.

References

1. Petuhova E. V., Krynickaya A. YU. Perspektivnost ispolzovaniya mikrokapsulirovannyh probioticheskikh kultur v pishchevoj promyshlennosti // Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta. – 2014. – № 22. – S. 257-260.
2. Abdollahzadeh S. M., Zahedani M. R., Rahmdel S., Hemmati F., Mazloomi, S. M. Development of *Lactobacillus acidophilus*-fermented milk fortified with date extract// LWT. 2018. Vol. 98. P. 577-582.

УДК 616-008, 664.8/9 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-394-396

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПЕКТИНОСОДЕРЖАЩИХ СМЕСЕЙ В ЭНТЕРАЛЬНОЙ КОРРЕКЦИИ ТРОФОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА

Демидова Т. И.¹, Демидов Д. А.², Орешкин Е. Н.¹

¹ ФГБОУ ВО Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия 125315, Москва, Волоколамское шоссе, д. 11
e-mail: DemidonaTI@mgupp.ru

² Российская академия медико-технических наук, Россия 129301, Москва, ул. Касаткина, д.3.
e-mail: amtn318@mail.ru

Разработаны специализированные пектиносодержащие смеси для коррекции дефицита и недостатка массы тела, представленные белково-углеводными комплексами. Доказана эффективность применения СПС в комплексной терапии для лечения дефицита и недостатка массы тела.

Ключевые слова: дефицит и недостаток массы тела, специализированные пектиносодержащие смеси, энтеропротекция и нутритивная поддержка, эффективность усвоения питательных веществ, динамика соматометрических показателей.

Нарушение трофологического статуса выявлено у пятидесяти процентов обследованных пациентов с дефицитом и недостатком массы тела..

Для решения проблемы дефицита и недостатка массы тела необходимо применение в комплексном лечении одновременной и ранней энтеропротекции и нутритивной поддержки [2]. Для этой цели был использован препарат специализированной пектиносодержащей смеси (ТУ 9199-002-69570395-2011). Состав специализированной пектиносодержащей смеси (СПС) включает: экстракты пектиносодержащего сырья, экстракт стевии, экстракт ботвы молодой столовой свеклы, концентрат и гидролизат сывороточных белков молока, витамины (С, В₁, В₂, В₆, РР), биотин. Оптимизация параметров разрабатываемого СПС проводилась путем моделирования рецептуры с использованием интегрального критерия сбалансированности. При проектировании также учитывалась сбалансированность белково-углеводного компонента (1:3-4) и соотношения небелковых килокалорий к белковому азоту (80-100:1).

Технология получения включает использование «мягких» режимов экстрагирования и обезвоживания распылением до влажности 3,8±0,1%. Содержание пектина в СПС – 3,9-4,0%, белка - 22,3 ± 0,02%.

Возможность и эффективность нутритивной поддержки в коррекции дефицита и недостатка массы тела мы изучили у двух групп добровольцев парной выборки, по 10 человек каждая, что является достаточным для получения репрезентативных выводов по результатам испытаний. Средняя величина индекса массы тела в опытной и контрольной группах наблюдения составляла 18,3 и 18,4 кг/м² соответственно, что свидетельствовало о недостаточной массе тела участников и требовало проведения мероприятий по их реабилитации в условиях стационара.

Больные получали одинаковое общее питание. В контрольной группе проводился докорм СПС в недовосстановленном питьевой водой виде, 2 раза в сутки, общей массой на человека за период

реабилитации– 400-500 гр., в течение 15 дней, и ежедневно на ужин в виде напитка 10 грамм СПС восстановленного в 250 мл воды.

Анализ результатов изучения динамики соматометрических показателей, показателей сердечно-сосудистой системы, физическую работоспособность и биохимический статус организма добровольцев, свидетельствует о недостаточной эффективности простого, механического увеличения рациона.

Введение в состав диеты СПС, содержащих широкий спектр эссенциальных микронутриентов (аминокислоты, витамины, минералы и микроэлементы), низко- и высокоэтерифицированных пектинов, а также физическая форма высокодисперсного порошка способствуют повышению эффективности усвоения организмом питательных веществ рациона, стимулируют интенсивность анаболических процессов в организме человека, оказывают благоприятное влияние на прирост массы тела и коррекцию нарушений характерных для белково-энергетической недостаточности [1,2].

Суточный привес в контрольной группе составил 0,053 кг/сутки, общий - 0,8 кг. В опытной группе 0,166 кг/сутки, общий 2,5 кг. Итоговое увеличение массы тела в контрольной группе составило 0,8 кг, а в опытной 2,5 кг, т.е. более чем в 3 раза. Таким образом, СПС являются эффективными нутриентами для лечения дефицита и недостатка массы тела.

Литература

1. Трескунов К. А. и др. Клиническая фитотерапия и фитохитодезтерерапия, биологически активные пищевые добавки (БАД) // Материалы 7-й Международной научной конференции, 23-24 января 2009 г., Черноголовка, – С. 140-145.
2. Попова Т. С. , Шестопапов А. Е., Тамазашвилли Т. Ш., Дейдерман И. Н. Нутритивная поддержка больных в критических состояниях. –М. – 2002. – С.320.

УДК 616-008, 664.8/9 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-394-396

RESEARCH OF MEDICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF SPECIALIZED PECTIN-CONTAINING MIXTURES IN THE ETHERAL CORRECTION OF THE TROPHOLOGICAL STATUS

Demidova T. I. ¹, Demidov D. A. ², Oreshkin E.N. ¹

¹ Moscow state University of food production, Moscow, Russia 125315, Moscow, Volokolamsk highway, d. 11
e-mail: DemidonaTI@mgupp.ru

² Russian Academy of Medical and Technical Sciences, Russia 129301, Moscow, ul. Kasatkina, 3.
email: amtn318@mail.ru

Specialized pectin-containing mixtures have been developed to correct deficiency and underweight, represented by protein-carbohydrate complexes. The effectiveness of the use of ATP in complex therapy for the treatment of deficiency and underweight is proved.

Key words: deficit and lack of body weight, specialized pectin-containing mixtures, enteroprotection and nutritional support, the efficiency of assimilation of nutrients, the dynamics of somatometric indicators.

Violation of trophological status was detected in fifty percent of the examined patients with deficiency and underweight.

To solve the problem of deficiency and lack of body weight, it is necessary to use simultaneous and early enteroprotection and nutritional support in complex treatment [2]. For this purpose, a specialized pectin-containing mixture preparation was used (TU 9199-002-69570395-2011). The composition of the specialized pectin-containing mixture (ATP) includes: extracts of pectin-containing raw materials, stevia extract, young beetroot leaf extract, milk whey protein concentrate and hydrolyzate, vitamins (C, B1, B2, B6, PP), biotin. The parameters of the developed ATP were optimized by modeling the formulation using the integral criterion of balance. The design also took into account the balance of the protein-carbohydrate component (1: 3-4) and the ratio of non-protein kilocalories to protein nitrogen (80-100: 1).

The production technology includes the use of "soft" extraction modes and spray dehydration to a moisture content of $3.8 \pm 0.1\%$. The pectin content in ATP is 3.9-4.0%, protein - $22.3 \pm 0.02\%$.

The possibility and effectiveness of nutritional support in correcting deficiency and lack of body weight was studied in two groups of volunteers of a paired sample, 10 people each, which is sufficient to obtain representative conclusions from the test results. The average body mass index in the experimental and control observation groups

was 18.3 and 18.4 kg / m², respectively, which indicated an insufficient body weight of the participants and required measures for their rehabilitation in a hospital.

Patients received the same total nutrition. In the control group, additional ATP was supplemented in the form of unreduced drinking water, 2 times a day, with a total weight per person for the rehabilitation period of 400-500 g., For 15 days, and daily for dinner in the form of a drink 10 grams of ATP restored in 250 ml water.

An analysis of the results of studying the dynamics of somatometric indicators, indicators of the cardiovascular system, physical performance and the biochemical status of the body of volunteers, indicates the lack of effectiveness of a simple, mechanical increase in diet.

Introduction to the composition of the diet of ATP containing a wide range of essential micronutrients (amino acids, vitamins, minerals and trace elements), low and highly esterified pectins, as well as the physical form of highly dispersed powder contribute to increasing the efficiency of assimilation of nutrients by the body. They stimulate the intensity of anabolic processes in the human body, have a beneficial effect on weight gain and correction of disorders characteristic of protein-energy insufficiency [1,2].

The daily gain in the control group was 0.053 kg / day, the total - 0.8 kg. In the experimental group, 0.166 kg / day, a total of 2.5 kg. The total increase in body weight in the control group was 0.8 kg, and in the experimental group 2.5 kg, i.e. more than 3 times. Thus, ATP are effective nutrients for the treatment of deficiency and underweight.

References

1. Treskunov K. A. et al. *Clinical herbal medicine and phytochitodes therapy, biologically active food additives (BAA) // Materials of the 7th International Scientific Conference, January 23-24, 2009, Chernogolovka, - P. 140-145.*
2. Popova T. S., Shestopalov A. E., Tamazashvili T. Sh., Deiderman I. N. *Nutritional support of patients in critical conditions. -M. - 2002. - P.320.*

УДК 577.21: 577.151.4: 637.334.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-396-399

ВЛИЯНИЕ ТОЧЕЧНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В МОЛЕКУЛЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА КОРОВЫ НА ЗАВИСИМОСТЬ ЕГО КОАГУЛЯЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ХЛОРИДА КАЛЬЦИЯ В МОЛОКЕ

Балабова Д.В.¹, Миронова А.В.², Пушкарев В.А.², Афанасьева Ю.Г.², Щербаков Д.Н.^{1,3}, Рудометов А.П.³, Ельчанинов В.В.²

¹ Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

² Федеральний Алтайский научный центр агробиотехнологий, Сибирский НИИ сыроделия, Барнаул, Россия

³ ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Россия

e-mail: ve3636@yandex.ru

Показано, что точечные аминокислотные замены Asp198→Lys, Asp156→Val и их сочетание, приводят к снижению чувствительности коагуляционной активности рекомбинантного химозина коровы к изменению концентрации CaCl₂ в молоке.

Ключевые слова: рекомбинантный химозин, аминокислотные замены, коагуляционная активность, концентрация хлорида кальция.

Для свертывания молока в сыроделии используется сычужный фермент (СФ) – препарат, получаемый из слизистых оболочек желудков телят, козлят и ягнят. Основным действующим компонентом СФ является аспаргатовая эндопептидаза - химозин (КФ 3.4.23.4). Химозин (Хн) коровы обладает уникальным комплексом технологических свойств и считается эталонным молоко-свертывающим ферментом (МФ). Во 2-ой половине XX века сформировался мировой дефицит СФ, который активизировал поиски его заменителей, однако, ни один из исследованных натуральных МФ не смог конкурировать с Хн коровы [1]. Развитие технологий рекомбинантных ДНК, позволило получить генно-инженерный аналог природного Хн. Несмотря на то, что в настоящее время рекомбинантный Хн (рХн) коровы используется в производстве различных видов сыров, поиск МФ с улучшенными технологическими характеристиками остается актуальной биотехнологической задачей, поскольку её решение позволит повысить эффективность сыроделия. Одним из направлений такого поиска является инжиниринг натуральных Хн. В частности, такой подход предполагает получение аналогов

Хн коровы с аминокислотными (а.к.) заменами способными улучшить технологические свойства природных ферментов.

Цель работы – изучить влияние а.к. замен на чувствительность коагуляционной активности (КА) рХн к изменению концентрации CaCl_2 в молоке.

Важную роль в обеспечении конформационной стабильности ферментов играют солевые мостики - электростатические взаимодействия, возникающие между положительно и отрицательно заряженными R-группами аминокислот. В молекуле Хн коровы в формировании солевых мостиков участвуют R-группы Asp в положениях 156 и 198. Предполагается, что Asp156 и Asp198 служат подходящими мишенями для искусственных мутаций, способных повлиять на технологические свойства Хн [2]. Объектами данного исследования стали 3 инженерных варианта рХн коровы с а.к. заменами в положениях 156 и 198: рХн-Bos-I (Asp156→Val), рХн-Bos-II (Asp198→Lys), рХн-Bos-V (Asp156→Val, Asp198→Lys). В качестве препарата сравнения использовали коммерческий рХн коровы (рХн-Bos-Ref).

В сыроделии для улучшения коагуляционных свойств пастеризованного молока, в него вносят CaCl_2 до конечной концентрации 1-5 мМ. При нарастании концентрации Ca^{2+} в молоке КА МФ увеличивается, что позволяет снизить его дозировку. Но вместе с КА возрастает и общая протеолитическая активность (ПА) фермента, что связано с опасностью снижения выхода и ухудшения органолептических свойств конечного продукта [3]. Поэтому, любой новый МФ, претендующий на использование в сыроделии, должен быть сопоставлен с рХн коровы по чувствительности к концентрации Ca^{2+} .

Продолжительность свертывания молока под действием всех исследованных ферментов сокращалась по мере увеличения в нем концентрации CaCl_2 (таблица 1). При этом инженерные варианты рХн коровы, оказались менее чувствительными к повышению содержания Ca^{2+} в субстрате, чем коммерческий рХн. Так, в диапазоне 1-5 мМ CaCl_2 , продолжительность коагуляции молока под действием рХн-Bos-Ref сокращалась на 27-63%, а для инженерных рХн этот параметр уменьшался, в среднем, на 16-47%.

Таблица 1 – Зависимость продолжительности коагуляции от концентрации CaCl_2

| Вариант рХн | Продолжительность коагуляции, % | | | | | |
|-------------|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 0 мМ | 1 мМ | 2 мМ | 3 мМ | 4 мМ | 5 мМ |
| рХн-Bos-I | 100 | 81 ± 1 | 70 ± 1 | 60 ± 1 | 55 ± 0 | 51 ± 1 |
| рХн-Bos-II | 100 | 84 ± 1 | 76 ± 0 | 66 ± 2 | 58 ± 0 | 52 ± 0 |
| рХн-Bos-V | 100 | 86 ± 3 | 77 ± 2 | 66 ± 1 | 61 ± 0 | 55 ± 1 |
| рХн-Bos-Ref | 100 | 73 ± 0 | 60 ± 2 | 48 ± 0 | 43 ± 2 | 37 ± 2 |

С учетом данных [3], можно сделать вывод о том, что различия в чувствительности к концентрации CaCl_2 между рХн-Bos-Ref и инженерными вариантами рХн обусловлены исключительно а.к. заменами. Сравнивая между собой экспериментальные рХн следует отметить, что замена Asp156→Val (рХн-Bos-I) усиливает чувствительность фермента к изменению концентрации Ca^{2+} по сравнению с заменой Asp198→Lys (рХн-Bos-II). Парадоксально, но сочетание двух замен приводит к более выраженному снижению чувствительности КА рХн-Bos-V к концентрации CaCl_2 в молоке.

Таким образом, показано, что а.к. замены Asp198→Lys, Asp156→Val или их сочетание в рХн коровы, приводят к снижению чувствительности КА полученных ферментов к содержанию CaCl_2 в молочном субстрате. Пониженная чувствительность к концентрации Ca^{2+} , является положительным технологическим свойством, т. к. позволяет варьировать количество вносимого в молочную смесь хлорида кальция, не опасаясь значительного увеличения общей ПА используемого МФ.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (номер темы FZMW-2020-0002, „Разработка продуцентов рекомбинантных ферментов для сыроделия“).

Литература

1. Uniacke-Lowe T., Fox P.F. Chymosin, pepsins and other aspartyl proteinases: structures, functions, catalytic mechanism and milk-clotting properties / Cheese: chemistry, physics and microbiology. Academic Press., 2017.- P. 69-113.
2. Novoselova E.S., Rudometov A.P., Kriger A.V., Elchaninov V.V. Effect of Salt Bridges Rupture on the Activity and Thermostability of Chymosin // BGRS\SB-2018; Abstracts. The 11th Int. Conf. (Novosibirsk, 20–25 August, 2018).- Novosibirsk, 2018.- С. 115.
3. Belenkaya S.V., Rudometov A.P., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Kriger A.V., Belov A.N., Koval A.D., Elchaninov V.V. Biochemical Properties of Recombinant Chymosin in Alpaca (*Vicugna pacos* L.) // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. Vol. 54. № 6. P. 569–576.

UDC 577.21: 577.151.4: 637.334.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-396-399

INFLUENCE OF POINT AMINO ACID SUBSTITUTIONS IN THE RECOMBINANT COW CHYMOSIN MOLECULE ON THE DEPENDENCE OF ITS COAGULATION ACTIVITY ON THE CONCENTRATION OF CALCIUM CHLORIDE IN MILK

Balabova D.V.¹, Mironova A.V.², Pushkarev V.A.², Afanasieva J.G.², Shcherbakov D.N.^{1,3}, Rudometov A.P.³, Elchaninov V.V.²

¹ Altai State University, Barnaul, Russia

² Federal Altay Scientific Centre of Agrobiotechnologies, Siberian Institute of Cheese Making, Barnaul, Russia

³ State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" Rospotrebnadzora, Koltsovo, Russia

e-mail: ve3636@yandex.ru

It is shown that point amino acid substitutions Asp198→Lys, Asp156→Val and their combination lead to a decrease in the sensitivity of coagulation activity of recombinant bovine chymosin to changes in the concentration of calcium chloride in milk.

Key words: recombinant chymosin, amino acid substitutions, milk-clotting activity, concentration of calcium chloride.

For clotting milk in cheese making, rennet (Rt) is used – a drug obtained from the stomach's mucosa of calves, goats and lambs. The main active component of Rt is aspartate endopeptidase - chymosin (EC 3.4.23.4). Bovine chymosin (Cn) has a unique complex of technological properties and is considered a reference milk-clotting enzyme (ME). In the 2nd half of the XX century, a global deficit of Rt was formed, which intensified the search for its substitutes, however, none of the studied natural ME could compete with bovine Cn [1]. The development of recombinant DNA technologies made it possible to obtain a genetically engineered analog of natural Cn. Despite the fact that bovine recombinant Cn (rCn) is currently used in the production of various types of cheeses, the search for ME with improved technological characteristics remains an urgent biotechnological task, since its solution will improve the efficiency of cheese production. One of the directions of this search is the engineering of natural Cn. In particular, this approach involves obtaining analogs of bovine Cn with amino acid (a.a.) replacements that can improve the technological properties of natural enzymes.

The aim of this work is to study the effect of a.a. substitutions on the sensitivity of coagulation activity (CA) of rCn to changes in the concentration of CaCl₂ in milk.

Salt bridges - electrostatic interactions that occur between positively and negatively charged R-groups of amino acids - play an important role in ensuring conformational stability of enzymes. In the bovine Cn molecule, R-groups of Asp at positions 156 and 198 participate in the formation of salt bridges. It is assumed that Asp156 and Asp198 serve as suitable targets for artificial mutations that can affect the technological properties of Cn [2]. The objects of this study were three engineering variants of the bovine rCn with a.a. substitutions in positions 156 and 198: rCn-Bos-I (Asp156→Val), rCn-Bos-II (Asp198→Lys), rCn-Bos-V (Asp156→Val, Asp198→Lys). Commercial bovine rCn (rCn-Bos-Ref) was used as a comparison drug.

In cheese making, to improve the coagulation properties of pasteurized milk, CaCl₂ is added to it to a final concentration of 1-5 mM. When the concentration of Ca²⁺ increases in milk, the CA of ME increases, which allows you to reduce its dosage. But along with CA, the total proteolytic activity (PA) of the enzyme increases, which is associated with the danger of reducing the yield and deterioration of the organoleptic properties of the final product [3]. Therefore, any new ME that claims to be used in cheese-making should be compared with the bovine rCn in terms of sensitivity to Ca²⁺ concentration.

The duration of milk coagulation under the action of all the studied enzymes decreased as the concentration of CaCl₂ in it increased (table 1). At the same time, engineering variants of bovine rCn were less sensitive to increasing the Ca²⁺ content in the substrate than commercial rCn. Thus, in the range of 1-5 mM CaCl₂, the duration of milk coagulation under the action of rCn-Bos-Ref was reduced by 27-63%, and for engineering rCn, this parameter decreased, on average, by 16-47%.

Table 1. Dependence of the duration of coagulation on the concentration of CaCl₂

| rCn option | Duration of coagulation, % | | | | | |
|-------------|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 0 mM | 1 mM | 2 mM | 3 mM | 4 mM | 5 mM |
| rCn-Bos-I | 100 | 81 ± 1 | 70 ± 1 | 60 ± 1 | 55 ± 0 | 51 ± 1 |
| rCn-Bos-II | 100 | 84 ± 1 | 76 ± 0 | 66 ± 2 | 58 ± 0 | 52 ± 0 |
| rCn-Bos-V | 100 | 86 ± 3 | 77 ± 2 | 66 ± 1 | 61 ± 0 | 55 ± 1 |
| rCn-Bos-Ref | 100 | 73 ± 0 | 60 ± 2 | 48 ± 0 | 43 ± 2 | 37 ± 2 |

Taking into account the data [3], it can be concluded that the differences in sensitivity to CaCl_2 concentration between rCn-Bos-Ref and engineering versions of rCn are due solely to a.a. substitutions. Comparing experimental rCn, it should be noted that replacing Asp156→Val (rCn-Bos-I) increases the sensitivity of the enzyme to changes in Ca^{2+} concentration compared to replacing Asp198→Lys (rCn-Bos-II). Paradoxically, the combination of two a.a. substitutions leads to a more pronounced decrease in the CA sensitivity of rCn-Bos-V to the concentration of CaCl_2 in milk.

Thus, it is shown that a.a. substitutions Asp198→Lys, Asp 156→Val, or their combination in the bovine rCn, lead to a decrease in the sensitivity of CA of the obtained enzymes to the content of CaCl_2 in the milk substrate. Reduced sensitivity to the concentration of Ca^{2+} is a positive technological property, since it allows you to vary the amount of calcium chloride introduced into the milk mixture, without fear of significant increase in the total PA of the ME used.

The work was performed within the framework of the state task of the Ministry of science and higher education of the Russian Federation (topic number FZMW-2020-0002, "Development of recombinant enzyme producers for cheese making").

References

1. Uniacke-Lowe T., Fox P.F. Chymosin, pepsins and other aspartyl proteinases: structures, functions, catalytic mechanism and milk-clotting properties / Cheese: chemistry, physics and microbiology. Academic Press., 2017.- P. 69-113.
2. Novoselova E.S., Rudometov A.P., Kriger A.V., Elchaninov V.V. Effect of Salt Bridges Rupture on the Activity and Thermostability of Chymosin // BGRS\SB-2018; Abstracts. The 11th Int. Conf. (Novosibirsk, 20–25 August, 2018.). - Novosibirsk, 2018.- С. 115.
3. Belenkaya S.V., Rudometov A.P., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Kriger A.V., Belov A.N., Koval A.D., Elchaninov V.V. Biochemical Properties of Recombinant Chymosin in Alpaca (*Vicugna pacos* L.) // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. Vol. 54. № 6. P. 569–576.

УДК 57.083.3 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-399-401

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ: РАЗРАБОТКА И ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ КОНТРОЛЕ РАЗЛИЧНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Сотников Д.В., Жердев А.В., Зверева Е.А., Гендриксон О.Д., Бартош А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33
e-mail: zherdev@inbi.ras.ru

Представлены разработки иммунохроматографических систем для выявления антибиотиков разных химических классов в пищевой продукции, включающие методические решения по усилению сигнала, управлению рабочим диапазоном и объединению до четырех анализов на одной тест-полоске. Предложены протоколы экспрессной пробоподготовки для тестирования контаминации молочных, мясных продуктов и меда.

Ключевые слова: антибиотики, безопасность продуктов питания, тест-полоски, иммуноанализ, пробоподготовка

Массовое неконтролируемое применение антибиотиков в животноводстве обуславливает риски для здоровья потребителей и необходимость эффективных средств массового экспрессного и нетрудоемкого контроля на всех стадиях производства и распространения продуктов питания. Данная задача может быть эффективно решена посредством иммунохроматографического анализа (ИХА), позволяющего получать результаты за 10-20 минут без дополнительных реагентов и оборудования. Однако традиционные тест-системы для ИХА обычно значительно уступают инструментальным методам анализа по пределам обнаружения и требуют дополнительной адаптации для соответствия нормативным требованиям к пороговым уровням контролируемых концентраций антибиотиков и к селективности по отношению к структурно близким соединениям. Проведенные и представленные ниже разработки продемонстрировали возможности управления аналитическими параметрами тест-систем, повышения чувствительности и информативности анализа.

Охарактеризована зависимость предела детекции в конкурентном ИХА от свойств наночастиц – маркеров. Определены требования к составу конъюгатов наночастица – антитело, выполнение которых приводит к снижению предела обнаружения аналита без потерь в интенсивности детектируемого сигнала. Показаны преимущества флуоресцентных наночастиц (квантовых точек) как маркеров для высокочувствительного анализа; возможность их выявления в более низких концентрациях позволяет изменять

соотношения иммунореагентов и тем самым сдвигать рабочий диапазон анализа, снижая предел обнаружения в 10-20 раз. Рассмотрены различные варианты ориентированной иммобилизации специфических антител на поверхности наночастиц (с использованием антивидовых антител, модуля биотин-стрептавидин), а также варианты с разным порядком аналитических реакций. Предложены способы усиления сигнала в ходе ИХА посредством управления последовательностью взаимодействия реагентов, включения в состав тест-систем дополнительных функционализированных наночастиц. Данный подход обеспечивает мечение единичных иммунных комплексов агрегатами наночастиц, формирующимися в ходе анализа, и приводит к снижению предела обнаружения до 50 раз. Показано соответствие экспериментальных закономерностей и данных математического моделирования процессов конкурентного ИХА.

Рассмотрены особенности перехода к мультиплексным тест-системам, объединяющих на одной тест-полоске процессы выявления нескольких антибиотиков. Показано влияние кинетических констант иммунных взаимодействий и локализации иммобилизованных на рабочей мембране реагентов на интенсивность аналитического сигнала и диапазон выявляемых концентраций. Предложен алгоритм для выбора наиболее эффективного расположения нескольких зон связывания на тест-полоске, исключающий эмпирический перебор всех возможных вариантов.

Для тестирования различных видов пищевой продукции, контаминированной антибиотиками – молочных и мясных продуктов, а также меда – сопоставлены различные способы пробоподготовки. Изучена кинетика высвобождения целевых аналитов в разных средах и при разных температурных режимах с целью сокращения продолжительности пробоподготовки. Установлена минимальная степень разбавления проб для разных видов пищевой продукции, обеспечивающая быстрое движение реагентов по мембране и формирование специфических комплексов.

В результате проведенных работ предложены новые высокочувствительные тест-системы для контроля от одного до четырех антибиотиков разных классов. Для выявления представителей групп бета-лактамов, аминогликозидов, линкозамидов, макролидов, сульфонамидов, фторхинолонов, а также тетрациклина и хлорамфеникола показано снижения пределов обнаружения аналитов до двух порядков по сравнению с традиционными тестами. Суммарная продолжительность анализа, включая пробоподготовку, – 20-25 мин; степень выявления антибиотиков (по сравнению с данными референтных инструментальных методов) – от 85% до 110%.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 20-76-10033).

UDC 57.083.3 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-399-401

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC SYSTEMS FOR DETECTING ANTIBIOTICS: DEVELOPMENT AND FEATURES OF APPLICATION IN THE CONTROL OF VARIOUS FOOD PRODUCTS

Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Zvereva E.A., Hendrickson O.D., Bartosh A.V., Dzantiev B.B.

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Leninsky prospect 33, 119071 Moscow, Russia

e-mail: zherdev@inbi.ras.ru

The development of immunochromatographic systems for the detection of antibiotics of different chemical classes in food products is presented, including methodological solutions for signal amplification, control of the working range and the combination of up to four analyzes on one test strip. Protocols of rapid sample preparation for testing contamination of dairy, meat products and honey are proposed.

Key words: antibiotics, food safety, test strips, immunoassay, sample preparation

Wide uncontrolled use of antibiotics in animal husbandry leads to risks for the health of consumers and the need for effective tools of mass, rapid and non-laborious control at all stages of production and distribution of food products. This task can be effectively solved by immunochromatographic analysis (ICA), which allows obtaining results in 10-20 minutes without additional reagents and equipment. However, traditional test systems for ICA are usually significantly inferior to instrumental methods of analysis in terms of detection limits and require additional adaptation to meet regulatory requirements concerning the threshold levels of controlled concentrations of antibiotics and selectivity for structurally related compounds. Our developments presented below have demonstrated

the possibilities of controlling the analytical parameters of test systems, increasing the sensitivity and information output of the analysis.

The dependences of the detection limit in competitive ICA on the properties of nanoparticles - markers have been characterized. The requirements for the composition of nanoparticle - antibody conjugates were determined, the accordance to which leads to a decrease in the detection limit of the analyte without loss in the intensity of the registered signal. The advantages of fluorescent nanoparticles (quantum dots) as markers for highly sensitive analysis were shown; the possibility of their detection in lower concentrations allows changing the ratio of immunoreagents and thereby shifting the working range of the analysis, reducing the detection limit by 10-20 times. Various variants of oriented immobilization of specific antibodies on the surface of nanoparticles (using anti-species antibodies, the biotin-streptavidin module), as well as variants with different orders of analytical reactions were considered. Methods for signal amplification in the course of ICA by controlling the sequence of reagents' interaction, including the use of additional functionalized nanoparticles were proposed. This approach ensured the labeling of single immune complexes with aggregates of nanoparticles formed during the analysis, and led to a decrease in the detection limit by up to 50 times. The correspondence of experimental regularities and data of mathematical modeling of the processes of competitive ICA was shown.

The features of the transition to multiplex test systems that combine detection of several antibiotics on one test strip were considered. The influence of kinetic constants of immune interactions and localization of reagents immobilized on the working membrane on the intensity of the registered signal and the range of detected concentrations was shown. An algorithm is proposed for choosing the most effective location of several binding zones on a test strip, which excludes an empirical comparison of all possible variants.

Methods of sample preparation were compared for testing various types of food products contaminated with antibiotics (dairy and meat products, honey). The kinetics of release of target analytes in different media and at different temperatures was studied in order to reduce the duration of sample preparation. The minimum degree of sample dilution for different types of food products was established, which ensured the rapid movement of reagents along membranes of test strips in the course of ICA and the rapid formation of specific complexes.

As a result of the work carried out, new highly sensitive test systems have been proposed for the control of one to four antibiotics of different classes. For representatives of the groups of beta-lactams, aminoglycosides, lincosamides, macrolides, sulfonamides, fluoroquinolones, as well as for tetracycline and chloramphenicol, it was shown that their detection limits were reduced to two orders of magnitude compared with traditional tests. The total analysis time, including sample preparation, is 20-25 minutes; the degree of antibiotic detection (in comparison with the data of reference instrumental methods) varies from 85% to 110%.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant 20-76-10033).

УДК 663.125 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-401-403

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ЦИТОМОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ПРИ СБРАЖИВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ПЛОДОВО-ЯГОДНОГО СУСЛА

Жилинская Н.Т.^{1,2}, Шитова А.С.¹, Анисимова И.Н.³

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
Санкт-Петербург, Россия, 195251, ул. Политехническая, 29

² Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им.Н.Н.Петрова
Санкт-Петербург, Россия, 197758, пос. Песочный, Ленинградская ул., 68

³ Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР)
Санкт-Петербург, Россия, 190000, ул. Большая Морская, 42
e-mail: jilinskie@mail.ru

Изучена активность винных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, используемых для сбраживания сусла из черной смородины, вишни и клюквы, по динамике изменения площади клеток, вычисляемой метода компьютерной цитоморфометрии.

Ключевые слова: дрожжи винные *Saccharomyces cerevisiae*, брожение, смородина черная, вишня, клюква, цитоморфометрические характеристики.

Актуальность исследования. Бродильную активность дрожжей оценивают по скорости потребления сбраживаемых сахаров, скорости выделения диоксида углерода и количеству этанола, образовавшегося в процессе брожения [1, 2], интенсивности размножения.

Цель исследования – оценить, по динамике изменения площади клеток, бродильную активность сухих дрожжей *Lalvin Bourgovin RC 212* штамма *Saccharomyces cerevisiae*, ранее не используемых в процессах ферментации суслу из черной смородины, вишни, клюквы для производства столового фруктового виноматериала.

Объекты, материалы и методы исследований. Использовали быстрозамороженные ягоды смородины черной, клюквы обыкновенной, плоды вишни садовой; коммерческие винные активные сухие дрожжи *Lalvin Bourgovin RC 212* штамма *Saccharomyces cerevisiae* [3]. Фиксированные и окрашенные препараты дрожжей готовили из суслу на 7, 14 и 21 сутки после начала ферментации. Цитоморфометрические характеристики дрожжей (общая площадь клетки, μm^2) получены с применением компьютерной программы анализа изображений «Image J» светооптического микроскопа «Nicon».

Результаты и их обсуждение. Динамика изменения площади дрожжевых клеток, используемых для сбраживания черносмородинового, вишневого и клюквенного суслу, представлена на рис. 1.

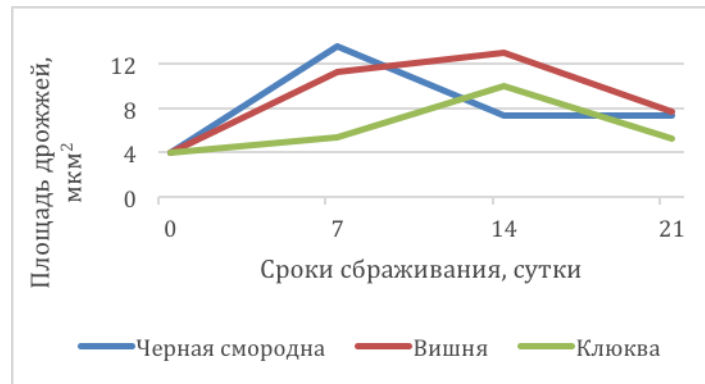


Рис. 1. Динамика изменения площади клеток винных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, применяемых для сбраживания различных видов плодово-ягодного суслу

Морфологическое состояние дрожжей на 7 сутки сбраживания черносмородинового суслу указывает на максимальную активность клеток в лог-фазе и начальном периоде стационарной фазы кривой роста микроорганизмов в закрытых системах.

Выводы. Изучение морфофункционального состояния клеток дрожжей методом компьютерной цитоморфометрии может быть рекомендована в качестве дополнительного метода оценки бродильной активности микроорганизмов.

Литература

1. Зайцева М.Ю., Баракова Н.В., Романов В.А., Жилинская Н.Т. // Влияние комплексных добавок на процесс сбраживания солодового суслу // Вестник Международной академии холода. – 2017. - № 1. - С.3-6.
2. Жилинская Н.Т., Шитова А.С., Орымбетова Г.Э., Абдижаппаррова Б.Т. // Исследование динамики изменений органолептических и физико-химических показателей в сбраживаемом сусле на основе плодово-ягодного сырья // XXI век: итоги прошлого и проблемы настоящего плюс. – 2020. - Т.9. - № 1 (49). - С.111-117.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-401-403

DYNAMICS OF *SACHAROMYCES CEREVISIAE* YEAST CYTOMORPHOMETRIC CHARACTERISTIC CHANGES DURING FRUIT AND BERRY WORT FERMENTATION

Zhilinskaya N. T.^{1,2}, Shitova A.S.¹, Anisimova I.N.³

¹ Peter the Great St.Petersburg Polytechnic University; 48, Novorossiyskaya str., St.Petersburg, 194021, Russia

² N.N.Petrov National Medical Research Center of Oncology; 68, Leningradskaya str., St.Petersburg, 197758, Russia

³ N.I.Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR); 42, Bolshaya Morskaya str., St.Petersburg, 190000, Russia

The activity of wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* used for black currant, cherry and cranberry fermentation was studied using cell area dynamics calculated by computer cytomorphometry method.

Key words: wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation, black currant, cherry, cranberry, digital cytomorphometric characteristics.

Research relevance. Yeasts fermentation activity is estimated by the rate of fermented sugar usage, carbon dioxide release, the amount of ethanol obtained during wort fermentation [1,2], the yeast proliferation intensity.

Research aim was to estimate, according to cell area change dynamics, the fermentation activity of dry yeast Lalvin Bourgovin RC 212 strain of *Saccharomyces cerevisiae*, which was not previously used in the black currant, cherry, and cranberry fermentation for the table fruit wine material production.

Objects, materials and research methods. We have used quick-frozen black currant, cranberry, garden cherry; commercial active dry wine yeast Lalvin Bourgovin RC 212 strain of *Saccharomyces cerevisiae* [3]. Fixed and stained yeast smears have been prepared on 7, 14 and 21 days after the fermentation beginning. Yeast digital cytomorphometric characteristics (total cell area, μm^2) were obtained using a computer program "Image J" of light-optical microscope "Nicon".

Results and discussion. Dynamics changes of cell area yeasts, using for black currant, cherry and cranberry wort fermentation, are shown in Fig.1.

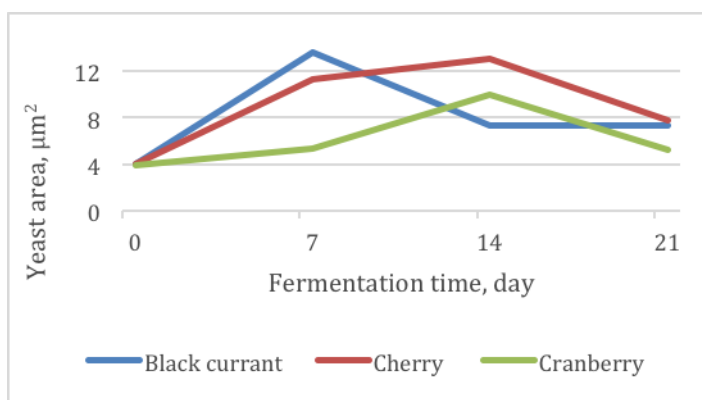


Fig. 1. Dynamics in cell area changes of wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* using for various types of fruit and berry wort fermentation

Morphological yeast study on the 7th day of black currant wort fermentation proves the cell maximum activity in the log-phase and in the initial period of the stationary phase of microorganism growth curve in closed systems.

Conclusions. The yeast morphologically functional state study by digital cytomorphometry could be recommended as an additional method for the fermentation activity microorganism estimation.

References

1. Zaytseva M.Y., Barakova N.V., Romanov V.A., Zhilinskaya N.T. The effect of complex supplements on 100 % barley malt wort fermentation process // Vestnik Mezhdunarodnoj akademii holoda. – 2017. – No 1.- P.3-6. (In Russ.). // DOI:10.21047/1606-4313-2017-16-1-3-6.
2. Zhilinskaya N.T., Shitova A.S., Orymbetova G.E., Abdizhapparova B.T. Study of organoleptic, physical and chemical change dynamics in fermented mash from fruit and berry raw materials //XXI centure: resumes of the past and challenges of the present plus. – 2020. – V. 9. - No 1 (49) – P.111-117. (In Russ.).

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-403-405

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОХРАТОКСИНА А

Бечева З.Р., Атанасова М.К., Иванов Я.Л., Годжеваргова Ц.И.

Кафедра биотехнологии, Технический факультет, Университет Проф. д-р Асена Златарова, Бургас, Болгария
e-mail: godjevargova@yahoo.com

Охратоксины являются возможными канцерогенами для человека. Целью данного исследования была разработка чувствительного конкурентного иммунофлуоресцентного анализа для определения охратоксин А (ОТА) на основе иммобилизованных на магнитных наночастицах (МНЧ) поликлональных антител против охратоксина и F(ab)₂ фрагментов. Конкурентный иммуноанализ проводили с использованием различных концентраций ОТА и постоянной концентрации ОТА, меченных флуоресцеин изотиоцианат (FITC). Аналитические характеристики анализа с иммобилизованным поликлональным антителом и фрагментом F(ab)₂ были очень близки.

Ключевые слова: охратоксин, магнитных наночастицах, фрагментация антител, OTA-OVA-FITC

Охратоксины - это высокотоксичные вторичные метаболиты, продуцируемые некоторыми грибами родов *Aspergillus* и *Penicillium*, которые могут содержаться в специях, изюме, зерновых, кофейных зернах, орехах, какао, пиве, вине, молоке. Международное агентство по изучению рака отнесло OTA к классу 2B, куда входят возможные канцерогены для человека. Разработка быстрых и чувствительных методов определения низких концентраций охратоксина А является актуальной задачей. Целью данного исследования была разработка чувствительного конкурентного иммунофлуоресцентного анализа для определения OTA на основе иммобилизованных на МНЧ поликлональных антител против охратоксина и F(ab)₂ фрагментов. К преимуществам использования МНЧ можно отнести стабилизацию иммобилизованных белков, проведение иммунореакции в гомогенной среде, легкое разделение иммобилизованных на МНЧ белков с помощью внешнего магнитного поля, быстрый и чувствительный анализ. Флуоресцентный конъюгат охратоксин А-овальбумин-флуоресцеинизоотиоцианат (OTA-OVA-FITC) получали в два этапа. Сначала синтезировали OTA-OVA с помощью бифункционального реагента гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида, который образовывал амидную связь через реакционноспособную карбоксильную группу OTA и свободную аминогруппу OVA. Концентрация белка в конъюгате OTA-OVA составила 2 мг/мл. Конъюгат OTA-OVA очищали гель-хроматографией и подтверждали состав методом абсорбционной спектроскопией. Для получения конъюгата OTA-OVA-FITC проводили прямое мечение FITC и последующую очистку гель-хроматографией. Получение конечного конъюгата подтверждали спектральными методами. Фрагмент F(ab)₂ был получен гидролизом поликлонального антитела против OTA с использованием фермента пепсина. F(ab)₂ фрагмент был выделен гель-хроматографией и имел молекулярный вес 100000 Да. Фрагменты F(ab)₂ и поликлональные антитела (пАт) против OTA были иммобилизованы на МНЧ с помощью глутарового альдегида. Количество связавшихся пАт и F(ab)₂ фрагментов составило 0,014 мг/мг МНЧ. Связывание между полученным конъюгатом OTA-OVA-FITC и F(ab)₂ фрагментами или пАт определяли с помощью иммуноферментного анализа. Определены оптимальные концентрации конъюгата OTA-OVA-FITC (7,3 мкг/мл) и МНЧ с иммобилизованными пАт или F(ab)₂ фрагментами (0,125 мг). Показано, что предел обнаружения иммуноанализа с иммобилизованными F(ab)₂ фрагментами составлял 0,08 нг/мл охратоксина А, а с иммобилизованными пАт - 0,10 нг/мл. Таким образом, разработан чувствительный иммуноанализ для определения охратоксина А на основе иммобилизованных на МНЧ поликлональных антител или F(ab)₂ фрагментов. Аналитические характеристики анализа с иммобилизованным поликлональным антителом и фрагментом F(ab)₂ были очень близки.

Работа выполнена при поддержке Болгарский национальный научный фонд, проект № ДН 17/03, 2017.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-403-405

MAGNETIC NANOPARTICLE BASED FLUORESCENCE IMMUNOASSAY FOR DETERMINATION OF OCHRATOXIN A

Becheva Z.R., Atanasova M.K., Ivanov Y.L., Godjevargova T.I.

*Department of Biotechnology, Faculty of Technical Science, "Prof. Dr Asen Zlatarov" University, Burgas, Bulgaria
e-mail: godjevargova@yahoo.com*

Ochratoxins are possible human carcinogens. The aim of this study is to develop a sensitive competitive immunofluorescent analysis for determination of ochratoxin A (OTA) on the base of immobilized polyclonal antibody against ochratoxin and F(ab)₂ fragment on magnetic nanoparticles (MNPs). Competitive immunoassay was performed by using variety concentrations of OTA and constant concentration of fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled OTA. The analytical characteristics of the analysis with immobilized polyclonal antibody and F(ab)₂ fragment were very closely.

Key words: ochratoxin, magnetic nanoparticles, antibody fragmentation, OTA-OVA-FITC

Ochratoxins are highly toxic secondary metabolites produced by several *Aspergillus* and *Penicillium* species that can be found in spices, raisins, cereal, coffee beans, nuts, cocoa, beer, wine, milk. OTA is classified by the International Agency of Research on Cancer as class 2B, possible human carcinogens. The development of rapid and sensitive methods for determination of low ochratoxin A concentrations is an up-to-date task. The aim of this research was to develop a sensitive competitive immunofluorescent analysis for determination of OTA on the base of immobilized polyclonal antibody against ochratoxin and F(ab)₂ fragment on MNPs. The application of MNPs ensures many advantages of the analysis – stabilization of immobilized proteins, immunoreaction in homogenized

environment, easily separation of immobilized proteins on MNPs by external magnetic field, rapid and sensitive analysis. A competitive agent fluorescent conjugate ochratoxin A-ovalbumin-fluorescein isothiocyanate (OTA-OVA-FITC) was prepared by two steps. First, the conjugate OTA-OVA was obtained by bifunctional reagent N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, which linked OTA via its reactive carboxyl group and OVA carrier protein via its free amine group, performing an amide bond. It was measured that the protein concentration of the OTA-OVA conjugate was 2 mg/mL. The OTA-OVA conjugate was purified by gel chromatography and was proved by absorption spectroscopy. Then, FITC direct labeling was made for preparation of OTA-OVA-FITC conjugate, and purification was made by gel chromatography. The final conjugate was proved by absorption and fluorescence spectra. F(ab)₂ fragment was obtained by hydrolysis of polyclonal antibody against OTA using enzyme pepsin. The F(ab)₂ fragment was isolated by gel chromatography and proved by electrophoreses – molecular weight 100 000 Da. The F(ab)₂ fragment and polyclonal antibody (pAb) against OTA were immobilized on MNPs by glutaraldehyde. The amount of bound pAb and F(ab)₂ fragment was measured - 0.014 mg/mg MNPs. The affinity binding between the obtained OTA-OVA-FITC conjugate and F(ab)₂ or pAb was determined by enzyme-linked immunosorbent assay with increasing concentrations of the antibody or F(ab)₂. The optimal conditions of immunofluorescence analysis were determined by variation of the amount of immobilized antibody or F(ab)₂ fragment and the amount of the conjugate OTA-OVA-FITC – 0.125 mg MNPs with immobilized antibody or F(ab)₂ fragment and 7.3 µg/mL conjugate. The competitive immunoassay was performed by using the immobilized polyclonal antibody and immobilized F(ab)₂ fragment. It was found that the detection limit of the immunoassay with immobilized F(ab)₂ fragment was 0.08 ng/ml ochratoxin A and with immobilized pAb was 0.10 ng/ml. In conclusion, a rapid, sensitive immunoassay for determination of ochratoxin A based on immobilized polyclonal antibody or F(ab)₂ fragment on MNPs was developed. The analytical characteristics of the analysis with immobilized polyclonal antibody and F(ab)₂ fragment were very closely.

This work was supported by the Bulgarian National Science Fund, project no. DN 17/03, 2017.

УДК 630.892 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-405-407

ПИЩЕВЫЕ ЛЕСНЫЕ РЕСУРСЫ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО РЕГИОНА

Корякина Н.А., Степакова Н.Н.

*Дальневосточное высшее общевойсковое командное ордена Жукова училище имени Маршала Советского союза К.К. Рокоссовского. Благовещенск, Россия
675000 Амурская область, г. Благовещенск ул. Ленина, 158
e-mail: koryakina.nata1405@yandex.ru*

В работе представлен обзор пищевых лесных ресурсов Дальневосточного Федерального округа: дикорастущего ягодного сырья, орехоплодного сырья и лекарственно-технического, основные направления его применения в промышленном производстве. Показаны объемы сборов пищевых лесных ресурсов по видам.

Ключевые слова: древесное сырьё, недревесное сырьё, дикорастущее ягодное сырьё, орехоплодовые растения.

Материальную основу социально-экономического развития государства обеспечивают природные ресурсы, сосредоточенные на его территории. Россия является одним из лидеров по запасам природных ресурсов. Лес - это один из важнейших хозяйственных ресурсов, являющийся сырьевой основой в производстве древесины и многих видов полезных дикорастущих и лекарственно-технических растений, охотничье-промысловых животных.

Цель работы провести обзор пищевых лесных ресурсов, сосредоточенных на территории ДФО. Теоретическую основу исследования составляют нормативные документы и научные публикации. Информационной базой выступают отчетные данные Федеральной службы государственной статистики и Единой межведомственной информационно-статистической системы. Методы исследования: аналитический и статистический.

В России площадь лесных насаждений составляет 1184,5 млн. га. Основу лесных ресурсов составляют леса сосредоточенные в двух регионах: Сибирском и Дальневосточном федеральных округах. Лесистость территории - 53,8 и 47,9 % соответственно. В остальных территориальных образованиях площадь лесов не превышает 10%[1]. Использование лесных ресурсов ведется по двум основным направлениям: заготовка древесины и другого древесного сырья, заготовка и переработка недревесных и пищевых лесных ресурсов. В группу пищевых лесных ресурсов входят дикорастущие плоды, ягоды, семена, орехи, грибы

и березовый сок. Именно на этот вид биоресурсов в настоящее время растет спрос, что обусловлено социально-экономическими изменениями, переориентацией потребителя на полезное, качественное, безопасное питание. На территории Дальнего Востока произрастает около 14 % всех биологических запасов дикорастущего ягодного сырья России, 64,9% биологического запаса орехов сосны кедровой и кедрового стланика и 49,8% запаса грибов [2]. Так, дикие ягоды представлены 109 видами, при этом 12 из них – плоды. Орехоплодные растения представлены кедром: сибирским и корейским, кедровым стлаником, лещинами, водяным орехом, орехом Маньчжурским и Зибольда. Среднегодовой запас орехов в ДФО – 32,3 тыс. тонн, а размер возможного сбора составляет 9,7 тыс. т., что свидетельствует о том, что промышленное освоение данного вида природного ресурса составляет 30%. Лекарственно-техническое сырье в Дальневосточном регионе представлено растениями 974 видов, из которых 200 официально считаются лекарственными, но в медицине используются только 70. Анализ данных по сбору пищевых лесных ресурсов по видам показал, что в ДФО наиболее востребованными являются грибы и дикорастущие ягоды, их расчетная доля сбора от суммарного объема сбора всех видов пищевых лесных ресурсов составляет 38,4 и 26,6% соответственно [3].

На сегодняшний день заготовка и переработка пищевых лесных ресурсов является одним из перспективных направлений в природопользовании. Развитие данной сферы даст импульс к развитию новых направлений в смежных отраслях – пищевой, перерабатывающей, фармацевтической промышленности и агропромышленном производстве и социальной сфере.

Литература

1. Суринов А.Е. Россия в цифрах 2018// Москва: Росстат – 2018 с.730-731.
2. Бабий Н.В. Научное обоснование и разработка технологии фитонапитков для населения Дальневосточного региона на основе природных адаптогенов. – Кемерово, 2017. – с. 15-17.
3. Большаков Б.М. Состояние и перспективы использования недревесных ресурсов леса. – Пушкино:ВНИИЛМ, 2013. – с. 7-11.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-405-407

FOOD FOREST RESOURCES OF THE FAR EASTERN REGION

Koryakina N.A., Stepakova N.N.

*The Far Eastern Higher Combined Arms Command Order of the Zhukov School named after Marshal of the Soviet Union K.K. Rokossovsky. Blagoveshchensk, Russia
675000 Amur Region, Blagoveshchensk Str. Lenin, 158.
e-mail: koryakina.nata1405@yandex.ru*

The paper presents an overview of food forest resources of the Far Eastern Federal District: wild berry raw materials, nut and fruit raw materials and medicinal products, the main directions of its application in industrial production. Volumes of food forest resources by species are shown.

Key words: wood raw materials, non-wood raw materials, wild berry raw materials, nut-fruit plants.

The material basis of the socio-economic development of the state is provided by natural resources concentrated on its territory. Russia is one of the leaders in reserves of natural resources. Forest - this is one of the most important economic resources, which is the raw material basis in the production of wood and many types of useful wild-growing and medicinal-technical plants, hunting and game animals.

The purpose of the work is to conduct a review of forest food resources concentrated in the Far Eastern Federal District. The theoretical basis of the study is normative documents and scientific publications. The information base is the reporting data of the Federal State Statistics Service and the Unified Interdepartmental Information and Statistical System. Research methods: analytical and statistical.

In Russia, the area of forest stands is 1184.5 million hectares. The basis of forest resources is made up of forests concentrated in two regions: the Siberian and Far Eastern Federal Districts. The forest cover of the territory is 53.8 and 47.9%, respectively. In other territorial entities, the forest area does not exceed 10% [1]. The use of forest resources is carried out in two main areas: harvesting of wood and other wood raw materials, harvesting and processing of non-timber and food forest resources. The group of forest food resources includes wild fruits, berries, seeds, nuts, mushrooms and birch sap. It is for this type of biological resources that demand is currently growing, due to socio-economic changes, consumer reorientation towards healthy, high-quality, safe nutrition. About 14% of all biological stocks of wild berry raw materials in Russia, 64.9% of the biological stock of pine nuts of cedar

and cedar dwarf peanuts and 49.8% of the stock of mushrooms grow in the Far East [2]. Thus, wild berries are represented by 109 species, with 12 of them being fruits. Walnut plants are represented by cedars: Siberian and Korean, cedar dwarf, hazel, water chestnut, Manchurian walnut and Siebold. The average annual supply of nuts in the Far Eastern Federal District is 32.3 thousand tons, and the size of the possible collection is 9.7 thousand tons, which indicates that the industrial development of this type of natural resource is 30%. Pharmaceutical raw materials in the Far Eastern region are represented by plants of 974 species, of which 200 are officially considered medicinal, but only 70 are used in medicine. Analysis of data on the collection of food forest resources by species showed that in the Far Eastern Federal District mushrooms and wild berries are most in demand, their estimated the share of the collection of the total collection of all types of food forest resources is 38.4 and 26.6%, respectively [3].

Today, the harvesting and processing of food forest resources is one of the promising areas in nature management. The development of this sphere will give an impetus to the development of new directions in related sectors - food, processing, pharmaceutical industry and agricultural production and social sphere.

References

1. Surinov A.Ye. *Rossiya v tsifrakh 2018*// Moskva: Rosstat – 2018.730-731.
2. Babiy N.V. *Nauchnoye obosnovaniye i razrabotka tekhnologii fitonapitkov dlya naseleniya Dal'nevostochnogo regiona na osnove prirodnykh adaptogenov.* – Kemerovo, 2017. 15-17.
3. Bol'shakov B.M. *Sostoyaniye i perspektivy ispol'zovaniya nedrevesnykh resursov lesa.* – Pushkino:VNILM, 2013. 7-11.

УДК 663.15 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-407-409

ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРОТЕАЗ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ БЕЗ ГОРЕЧИ

Костылева Е.В., Середа А.С., Великорецкая И.А., Минеева Д.Т., Цурикова Н.В.

*Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии (ВНИИПБТ) – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи
Москва, Россия, 111033, ул. Самокатная, 4б
e-mail: ekostyleva@list.ru*

Исследовано влияние содержания в ферментных препаратах нейтральных и сериновых протеаз на горечь полученных с их помощью гидролизатов. Из коллекции штаммов ВНИИПБТ выбран продуцент *Vacillus subtilis* 359 с соотношением сериновой и нейтральной протеазы аналогичным препарату Neutrase, обеспечивающим получение белковых гидролизатов без горечи.

Ключевые слова: нейтральная протеаза, сериновая протеаза, белковые гидролизаты, горечь

Актуальным направлением биотехнологии является получение белковых гидролизатов, которые характеризуются высокой питательной эффективностью и обладают рядом необходимых функциональных свойств для применения в пищевой промышленности. В процессах переработки белоксодержащего сырья предпочитают использовать бактериальные сериновые протеазы, отличающиеся широкой субстратной специфичностью и способностью расщеплять трудногидролизуемые связи. Однако существенным недостатком сериновых протеаз при использовании в пищевой промышленности является сильная горечь образующихся пептидов. Для получения гидролизатов с требуемыми функциональными параметрами и удовлетворительными органолептическими характеристиками используют препараты, содержащие нейтральную протеазу.

Целью работы являлось исследовать влияние соотношения нейтральных и сериновых протеаз в ферментных препаратах (ФП) на горечь полученных с их помощью гидролизатов, выбрать ФП, обеспечивающий получение гидролизатов с наименьшей горечью, и выявить в коллекции ВНИИПБТ штамм бактерий, обладающий аналогичным составом основных секретируемых протеаз.

Соотношение активности сериновой и нейтральной протеаз в препаратах определяли по протеолитической активности (ПА), измеренной с внесением ингибитора сериновых протеаз – фенилметилсульфонил фторида (PMSF) и без. Для определения горечи гидролиз казеина проводили в течение 2 ч при 40 °С, при концентрации субстрата – 100 г/л, дозировке ФП - 1 ед ПА/г субстрата. Горечь оценивали органолептически.

Наиболее сильной горечью обладали гидролизаты, полученные с ФП Alcalase, активность которого полностью представлена действием сериновой протеазы (таблица 1). Достаточно высокую горечь продемонстрировал Protamex, содержащий нейтральную и сериновую протеазы из различных бактериальных источников. Наименьшей горечью характеризовался ФП Neutrase, активность которого в присутствии PMSF снижалась на 44%. Действием сериновой протеазы обусловлено 59% активности отечественного препарата Протосубтилин, что объясняет более высокую горечь полученных с его помощью гидролизатов в сравнении с Neutrase.

Несколько штаммов *Bacillus subtilis* из коллекции ВНИИПБТ прокультивировали глубинно, определяя в супернатантах культуральной жидкости (КЖ) активность нейтральной и сериновой протеазы. Из КЖ штамма *B. subtilis* 359 с соотношением активности нейтральной и сериновой протеазы 52 и 48%, соответственно, был получен сухой препарат с соотношением протеаз близким к Neutrase, обеспечивающий получение гидролизатов казеина без горечи.

Таблица 1. Зависимость горечи гидролизатов казеина от соотношения активности нейтральной и сериновой протеазы в используемых ФП

| Ферментный препарат | Активность нейтральной и сериновой протеаз в ФП, % | | Оценка горечи гидролизата |
|--------------------------------------|--|-----------|---------------------------|
| | Нейтральная | Сериновая | |
| Alcalase (Novozymes A/S) | - | 100 | Очень горький |
| Protamex (Novozymes A/S) | 33 | 67 | Горький |
| Протосубтилин (ООО ПО Сиббиофарм) | 41 | 59 | Горький |
| Neutrase (Novozymes A/S) | 56 | 44 | Негорький |
| <i>B. subtilis</i> 359 | 52 | 48 | Негорький |

В результате проведенных экспериментов показана перспективность применения штамма *B. subtilis* 359 для производства отечественных ФП для пищевой промышленности, обеспечивающих получение белковых гидролизатов без горечи.

Работа выполнена в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2019–2021 годы (тема № 0529-2019-0066).

UDC 663.15 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-407-409

PREPARATIONS OF BACTERIAL PROTEASES FOR THE PRODUCTION OF PROTEIN HYDROLYSATES WITHOUT BITTERNESS

Kostyleva E.V., Sereda A.S., Velikoretskaya I.A., Mineeva D.T., Tsurikova N.V.

*All-Russian Research Institute of Food Biotechnology (VNIIPBT) - a branch of the Federal State Budgetary Institution of Science, Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology and Food Safety
Moscow, Russia, 111033, Samokatnaya str., 4^p
e-mail: ekostyleva@list.ru*

The effect of the neutral and serine proteases ratio in enzyme preparations (EP) on the bitterness of casein hydrolysates was studied. *Bacillus subtilis* 359 strain producing proteolytic complex with a serine to neutral protease ratio similar to Neutrase was selected from VNIIPBT strains collection. The preparation from *B. subtilis* 359 culture liquid provides obtaining protein hydrolysates without bitterness.

Key words: neutral protease, serine protease, protein hydrolysates, bitterness

An urgent area of biotechnology is the production of protein hydrolysates with high nutritional efficiency and a number of necessary functional properties for use in the food industry. In most processes of protein-containing raw materials treatment, bacterial serine proteases are preferred, which are characterized by broad substrate specificity and the ability to cleave hardly hydrolyzable bonds. However, a significant drawback of serine proteases when used in the food industry is the strong bitterness of the resulting peptides. To obtain hydrolysates with a moderate degree of hydrolysis, the required functional parameters and satisfactory organoleptic characteristics, preparations containing the neutral protease are used.

The aim of the research was to study the effect of the neutral and serine proteases ratio in commercial enzyme

preparations (EP) on the bitterness of the obtained hydrolysates, to select the EP providing the hydrolysates without bitterness, and to identify in VNIIPBT collection *Bacillus subtilis* strain with the same composition of the basic secreted proteases.

The ratio of serine to neutral protease activity was determined by proteolytic activity (PA), measured with the addition of a serine protease inhibitor - phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and without it. To determine bitterness, casein was hydrolyzed for 2 h at 40 °C, the substrate concentration - 100 g / l, EP dosage - 1 PA unit / g of the substrate. Bitterness was evaluated organoleptically.

The hydrolysates obtained using Alcalase with proteolytic activity almost completely represented by the action of serine protease, were characterized by the strongest bitterness (Table 1). A fairly high degree of bitterness was demonstrated by Protamex obtained by mixing neutral and serine proteases from various bacterial sources. The least bitterness was observed in Neutrase which proteolytic activity decreased by 44% in the presence of PMSF. It was found that 59% of the proteolytic activity of the domestic EP Protosubtilin is due to the action of serine protease, which results in increased bitterness of hydrolysates obtained using Protosubtilin in comparison with Neutrase.

Several *Bacillus subtilis* strains from VNIIPBT collection were cultured in shaking flasks. The ratio of neutral and serine protease activities was determined in the supernatants of the culture liquid (CL). From the CL of *B. subtilis* strain 359 with neutral and serine protease activity ratio of 52 and 48%, respectively, a concentrated freeze dried preparation with the major proteases ratio close to Neutrase was obtained, providing casein hydrolysates without bitterness.

Table 1. The dependence of casein hydrolysates bitterness on the ratio of neutral and serine protease activities in the EP

| Enzyme preparation | The activity of neutral and serine proteases in EP, % | | Hydrolyzate bitterness evaluation |
|------------------------------------|---|--------|-----------------------------------|
| | Neutral | Serine | |
| Alcalase (Novozymes A/S) | - | 100 | Very bitter |
| Protamex (Novozymes A/S) | 33 | 67 | Bitter |
| Protosubtilin (LLC PO Sibbiopharm) | 41 | 59 | Bitter |
| Neutrase (Novozymes A/S) | 56 | 44 | Non-bitter |
| <i>B. subtilis</i> 359 | 52 | 48 | Non-bitter |

The results obtained showed the prospects of *B. subtilis* 359 strain application for the production of domestic enzyme preparations for the food industry, providing protein hydrolysates without bitterness.

The work was done within the framework of the government assignment no. 0529-2019-0066.

УДК: 606.547.96 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-409-411

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ ЗЕРНА ГОРОХА В ПИЩЕВЫЕ И КОРМОВЫЕ БЕЛКОВЫЕ КОНЦЕНТРАТЫ

Д.С.Куликов¹, Р.В.Уланова², В.А.Гулакова¹, В.В.Колпакова¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт крахмалопродуктов – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем имени В.М. Горбатова» РАН, Россия
140051, Красково, Некрасова, 11, e-mail: denismalah@mail.ru, 89037098123, e-mail: Val-kolpakova@rambler.ru, 8915-285-84-50

² Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия
107143, Москва, 60-летия Октября, 7, e-mail: colodovnicova@rambler.ru, 89154607039

Приводятся данные по разработке биотехнологии пищевого белкового концентрата из зерна гороха и биоконверсии зерновой сыворотки дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* 121 и новым штаммом гриба *Geotrichum candidum* 977 с образованием кормового микробно-растительного препарата.

Ключевые слова: горох, экстракты, белковый концентрат, биоконверсия химический состав, аминокислотный состав.

Цель работы - разработка основ технологии белкового концентрата (БК) из зерна гороха и кормовых микробно-растительных концентратов (МПК) биоконверсией вторичного продукта переработки зерна на БК – зерновой

сыворотки консорциумом дрожжей *S. cerevisiae* и гриба *G. candidum* 977. Сегодня активно разрабатываются биотехнологии и ищутся новые источники получения пищевых и кормовых белковых препаратов. Актуально направление вовлечения в схемы переработки зерна био конверсии вторичных продуктов. Белковые препараты и биомасса микроорганизмов предназначена для людей, животных, птицы в целях повышения усвоения и продуктивности. Доказано, например, что добавление в рацион крупного рогатого скота *S. cerevisiae* и/или *A. oryzae* с вторичными продуктами от экстракции белка гороха получен пищевой МПК для замены мяса [1]. К переработке зерна бобовых культур в последнее время приковано определенное внимание, в то же время процессы биотрансформации для технологических схем мало изучены, поэтому сегодня исследования в данном направлении достаточно актуальны. Зерно гороха сорта «Ямал» выращено в Алтайском крае в 2017 году. Сыворотка, остающаяся после выделения БК из гороховой муки, содержала 11,6% влаги и массовую долю, % на СВ: белка (Nx6,25) – 25,7; золы – 2,67; жира – 1,46; крахмала – 51,50; углеводов – 18,76. С целью выделения БК и зерновой сыворотки использовали ферменты от фирмы Novozymes A/S (Дания): Shearzym 500 L, Viscoferm L, Fungamyl 800 L, AMG 300 L 2500, Distizym Protacid - от фирмы Erbslon. Гриб *G. candidum* 977 и дрожжи *S. cerevisiae* 121 использовали из коллекции Института микробиологии. Филогенетическое положение нового штамма *G. candidum* 977 установлено с ФГБУ ГосНИИгенетика (регистрационный № ВКПМ У-300). Белки из гороховой суспензии экстрагировали постадийно с ФП (целлюлаза, ксиланаза, амилазы протеазы) [2] при гидромодуле 1:15, концентрации ФП 1,5 %/г белка, температуре 55±1 оС, скорости перемешивания 180±10 мин⁻¹. Сыворотка, остающаяся от выделения белков, содержала азотистые вещества, фруктозу, глюкозу, мальтозу, мальтотриозу и др. Микроорганизмы подбирали из дрожжей родов *Pichia*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Saccharomyces* и микромицетов *Geotrichum*, *Penicillium*. С наибольшей скоростью произрастали представители родов *Pichia*, *Saccharomyces* и *G. candidum* 977 (рисунок). *G. candidum* 977 произрастал в широком диапазоне pH и регулировал кислотность среды с подщелачиванием. Изучили влияние pH субстрата, температуры, количества посевного материала на образование биомассы в течение 2 суток и определили эффективные параметры. Наименьшее количество белка синтезировалось в биомассе с грибом *G. candidum* 977 (16,39±0,31 %), наибольшее - с *G. candidum* 977 + *S. cerevisiae* (61,68±0,47) Культуральную жидкость с биомассой и одну биомассу высушивали и получали МПК-2 и МПК-1. Химический состав МПК-2 из гороховой сыворотки приведен в таблице. МПК-2 в корме для крыс не изменил цвет, запах, однородность. Аппетит, рост животных и поедание корма в течение 25 суток такие же, как у контрольной группы. Не было разницы по пищеварению, поведению и микрофлоре фекальных образцов. МПК – перспективный компонент для включения в состав рецептов комбикормов.

В итоге, нами разработана комплексная схема переработки гороха на БК и МПК, требующая апробации в опытно-промышленных условиях.

Литература

1. Souza Filho P.F., Nair R.B., Andersson D. et al. Vegan mycoprotein concentrate from pea processing industry byproduct using edible filamentous fungi // *Fungal Biology and Biotechnology*. 2018. № 5. P. 5-8. DOI: 10.1186/s40694-018-0050-9
2. Андреев Н.Р., Колпакова В.В., Кравченко И.К. и др. Утилизация вторичных продуктов переработки тритикале с получением кормового микробно-растительного концентрата для прудовых рыб // *Юг России: экология. Развитие*. – 2017. – № 4. – С. 90-104. DOI:10.18470/1992-1098-2017-4-90-1

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-409-411

BIOTRANSFORMATION OF COMPONENTS OF PEA GRAIN IN FOOD AND FODDER PROTEIN CONCENTRATES

D.Kulikov¹, R.Ulanova², V.Gulakova¹, V.Kolpakova¹

¹ All-Russian Research Institute for Starch Products – Branch of V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Russia
140051, Kraskovo, Nekrasov, 11

² S.N Vinogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center “Fundamental Foundations of Biotechnology”, of Russian Academy of Sciences, Russia
107143, Moscow, 60th anniversary of the October Revolution, 7

The data were obtained on the development of biotechnology of food protein concentrate from pea grains and bioconversion of cereal serum with *Saccharomyces cerevisiae* 121 yeast and a new strain of the fungus *Geotrichum candidum* 977 with the formation of a feed microbial-plant preparation.

Key words: peas, extracts, protein concentrate, bioconversion chemical composition, amino acid composition.

The purpose of the work is to develop the fundamentals of the technology of protein concentrate (PC) from pea grains and feed microbial-plant concentrates (MPC) by bioconversion of the secondary product of grain processing on PC - whey by a consortium of yeast *S. cerevisiae* and fungus *G. candidum* 977. Today biotechnologies and new sources of food and feed protein preparations are being sought. The direction of involving bioconversion of secondary products in grain processing schemes is relevant. Protein preparations and biomass of microorganisms are intended for people, animals, poultry in order to increase absorption and productivity. It has been proved, for example, that the addition of *S. cerevisiae* and / or *A. oryzae* with secondary products from pea protein extraction to the diet of cattle was obtained by food MPC for meat replacement [1]. Lately, a certain attention has been riveted to the processing of legume crops. At the same time, the processes of biotransformation for technological schemes have been little studied, so today research in this direction is quite relevant. Yamal pea grain was grown in the Altai Territory in 2017. The serum remaining after the isolation of PC from pea flour contained 11.6% moisture and mass fraction, % by weight of DS: protein (Nx6.25) - 25.7; ashes - 2.67; fat - 1.46; starch - 51.50; carbohydrates - 18.76. In order to isolate PC and grain serum, enzyme preparations (EP) from Novozymes A/S (Denmark) were used: Shearzym 500 L, Viscoferm L, Fungamyl 800 L, AMG 300 L 2500, Distizym Protacid - from Erbslon. The fungus *G. candidum* 977 and the yeast *S. cerevisiae* 121 were used from the collection of the Institute of Microbiology. The phylogenetic position of the new strain *G. candidum* 977 was established with the Federal State Budget Scientific Research Institute of Genetics (Registration No. VKPM Y-300). Proteins from a pea suspension were extracted stepwise with EP (cellulase, xylanase, protease amylase) [2] at a hydromodule of 1:15, EP concentration of 1.5%/g protein, temperature 55 ± 1 °C, stirring speed 180 ± 10 min⁻¹. The serum remaining from the isolation of proteins contained nitrogenous substances, fructose, glucose, maltose, maltotriose, etc. Microorganisms were selected from the yeast of the genera *Pichia*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Saccharomyces* and micromycetes *Geotrichum*, *Penicillium*. The representatives of the genera *Pichia*, *Saccharomyces*, and *G. candidum* 977 grew most rapidly (figure). *G. candidum* 977 grew in a wide pH range and regulated the acidity of the medium with alkalization. We studied the effect of substrate pH, temperature, and the amount of seed on the formation of biomass within 2 days and determined the effective parameters. The smallest amount of protein was synthesized in biomass with *G. candidum* 977 fungus ($16.39 \pm 0.31\%$), the largest - with *G. candidum* 977 + *S. Cerevisiae* (61.68 ± 0.47) Culture fluid with biomass and one biomass dried and received MPC-2 and MPC-1. The chemical composition of MPC-2 from pea serum is shown in the table. It was found that MPC-2 in rat food did not change its color, smell, or uniformity. The appetite, growth of animals, and the degree of feed ingestion for 25 days are the same as in the control group. There was no difference in digestion, behavior and microflora of fecal samples. MRK is a benign ingredient, it is promising for inclusion in the composition of feeds and compound feed recipes.

As a result, we have developed a comprehensive scheme for the processing of peas at PC and MPC, which requires testing under experimental industrial conditions.

References

1. Souza Filho P.F., Nair R.B., Andersson D. et al. Vegan mycoprotein concentrate from pea processing industry byproduct using edible filamentous fungi // *Fungal Biology and Biotechnology*. 2018. № 5. P. 5-8. DOI: 10.1186/s40694-018-0050-9
2. Andreev N.R., Kolpakova V.V., Kravchenko I.K. et al. Utilization of secondary triticale processing products with production of fodder microbial-vegetative concentrate for pond fish // *South of Russia: ecology. Development*. 2017. № 4. P. 90-104. DOI: 10.18470/1992-1098-2017-4-90-1 [In Russian]

УДК 664: 637.5 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-411-413

ИННОВАЦИОННЫЙ ДЕЗИНФЕКТАНТ «АВЕРДЕЗ» КАК ФАКТОР, СПОСОБСТВУЮЩИЙ РЕАЛИЗАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРОДУКТИВНОСТИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Мирзаева К.М.¹, Глухова П.Ю.³, Мирзаев М.Н.², Кулица М.М.¹

¹ Общество с ограниченной ответственностью Научно-производственное объединение «ЭКОБИОВЕТ», Россия 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д.23, стр.8 email: wagasi@mail.ru

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина», Москва, Россия 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д.23

³ АО «ПРОДО Птицефабрика Калужская», Калужская область, Россия 248032, Калужская область, Дзержинский район, с. Льва-Толстого

Работа посвящена изучению возможности применения нового комплексного дезинфектанта «Авердез» в

качестве одного из факторов, способствующего реализации генетически заложенного потенциала продуктивности перепелов. Как следует из полученных данных, при применении для санации воздушной среды птичника средство «Авердез» оказывает биоцидное действие одновременно на вредные микроорганизмы и насекомых, это способствует интенсификации развития птицы.

Ключевые слова: дезинфектант, авермектины, полигексаметиленгуанидина хлорид (ПГМГ), четвертичное аммонийное соединение (ЧАС), колониеобразующие единицы, аэрозоль.

Как известно, для полной реализации генетически заложенного учеными уровня продуктивности сельскохозяйственных животных и получения высоких экономических показателей необходимо не только обеспечение их качественными кормами, но и требуется постоянное проведение ветеринарно-санитарных мероприятий, где дезинфекция занимает важнейшее место. Исходя из этого и учитывая известное явление - формирование у микроорганизмов и паразитов резистентности к ранее применяемым дезинфектантам - разработка новых высокоэффективных дезинфектантов носит актуальный характер.

Исследуемый в данной работе инновационный дезинфектант «Авердез» содержит в качестве действующих веществ полигексаметиленгуанидина хлорид (ПГМГ), четвертичное аммонийное соединение (ЧАС) и соединения авермектинового ряда (абамектин, ивермектин, гемисукцинат авермектина В_{1а} [1]). Сбалансированный состав компонентов дезинфектанта обеспечивает синергетический эффект действующих веществ, который гарантирует широкий спектр биоцидного действия: одновременно против грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов, дрожжей, вирусов, водорослей, вшей, блох, личинок и взрослых особей мух, гамазовых и иксодовых клещей.

Производственная проверка целевой эффективности средства «Авердез» была проведена в фермерском перепеловодческом хозяйстве КФХ «Сказка», Рязанской области. Выбранные для опыта два помещения птичника аналогичны по основным параметрам: время посадки, режимы кормления, поения, содержания и соответствовали общепринятым нормативам. До обработки помещений препаратом было проверено санитарно-микробиологическое состояние воздуха.

Санацию воздуха помещений проводили с помощью мобильного аэрозольного генератора МАГ-2, обеспечивающим дисперсность аэрозольных частиц от 5 до 50 мкм. Для обработки использовали рабочий раствор в дозе 5-7 мл/м³. Дезинфицирующую эффективность препарат оценивали путем определения числа микроорганизмов в воздухе помещений до и после обработки.

Из полученных данных следует, что число колониеобразующих единиц (КОЕ) на МПА и СА (бактерий и микроскопических грибов) до дезинфекции помещений было в среднем 14320 колоний/м³, а после обработки (через 30 минут после обработки) сократилось в 6,4 раза и составило 2238 КОЕ/м³. Отмечается также резкое снижение количества мух в производственных помещениях, обработанных препаратом «Авердез». Несомненно, это способствует снижению негативного давления окружающей условно патогенной микрофлоры и насекомых на физиологическое состояние перепелов и повышению среднесуточных привесов. Постепенное возвращение санитарно-микробиологического состояния воздушной среды птичника к исходному состоянию происходит в течение 2,5-3,0 недель после обработки.

Таким образом, применение средства «Авердез» в присутствии птицы для дезинфекции помещений снижает общее микробное число в птичнике, положительно влияет на такой интегральный показатель реализации генетического потенциала, как прирост массы тела. Препарат не оказывает негативного воздействия на организм в целом и на респираторный тракт (легкие, трахеи), что подтверждено гистологическими исследованиями, проведенными на 3, 14 и 20 сутки после обработки.

Средство «Авердез» позволяет одновременно проводить дезинсекцию, дезинфекцию и дезакаризацию, что в свою очередь повышает целевую эффективность мероприятий и снижает экономические, трудовые и временные затраты.

Литература

1. Заварзин И.В., Джафаров М.Х., Колобов А.В., Мирзаев М.Н., Чернобутова Е.И., Бобова Т.А. 5-О-Сукциноилавермектин, способ его получения и антипаразитарное средство на его основе // Патент РФ № 2453553 С1, опубл. 20.06.2012.

UDC 664: 637.5 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-411-413

INNOVATIONAL DISINFECTANT «AVERDEZ» AS A FACTOR FACILITATING THE IMPLEMENTATION OF THE GENETIC POTENTIAL OF PRODUCTIVITY OF AGRICULTURAL ANIMALS

Mirzaeva K.M.¹, Glukhova P.Yu.³, Mirzaev M.N.², Kylitsa M.M.¹

¹ Limited Liability Company Scientific Production Association «ECOBIOVET», Moscow, Russia
109472, Moscow, Academician Skryabin St., 23 bldg. 8
email: wagasi@mail.ru

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin",
109472, Moscow, Academician Skryabin St., 23

³ JSC «PRODO Kaluga Poultry Factory», Russia
248032, Kaluga region, Dzerzhinsky district, village of Lev Tolstoy

The work is devoted to studying the possibility of using the new complex disinfectant «Averdez» as one of the factors contributing to the realization of the genetically inherent potential of quail productivity. As follows from the data obtained, when using for the sanitation of the air environment of the poultry house drug «Averdez» has a biocidal effect on harmful microorganisms and insects at the same time, this contributes to the intensification of bird development.

Key words: disinfectant, avermectins, polyhexamethylene guanidine chloride (PHMG), quaternary ammonium compound (QAC), colony forming units, aerosol.

As you know, for the full realization of the level of productivity of farm animals genetically laid down by scientists and to obtain high economic indicators, it is necessary not only to provide them with high-quality feed, but also require constant veterinary and sanitary measures, where disinfection takes an important place. Based on this and taking into account the well-known phenomenon - the formation of resistance to previously used disinfectants in microorganisms and parasites - the development of new highly effective disinfectants is relevant.

The innovational disinfectant «Averdez» investigated in this work contains polyhexamethylene guanidine chloride (PHMG), a quaternary ammonium compound (QAC) and avermectin compounds (abamectin, ivermectin, avermectin hemisuccinate B_{1a} [1]) as active substances. The balanced composition of the components of the disinfectant provides a synergistic effect of the active substances, which guarantees a wide range of biocidal action: simultaneously against gram-positive and gram-negative bacteria, fungi, yeast, viruses, algae, lice, fleas, larvae and adult flies, gamasid and ixodid ticks.

A production audit of the target effectiveness of the drug «Averdez» was carried out at the Skazka peasant farms in Ryazan Oblast. The two houses of the poultry house selected for the experiment are similar in basic parameters: planting time, feeding, watering, and maintenance regimes and comply with generally accepted standards. Before processing the premises with the drug, the sanitary-microbiological state of the air was checked.

The air was sanitized using the MAG-2 mobile aerosol generator, which ensured dispersion of aerosol particles from 5 to 50 microns. For processing, we used a working solution in a dose of 5-7 ml/m³. The disinfecting effectiveness of the drug was evaluated by determining the number of microorganisms in indoor air before and after treatment.

From the data obtained it follows that the number of colony forming units (CFU) per MPA and CA (bacteria and microscopic fungi) before disinfection of the premises was on average 14,320 colonies/m³, and after processing (30 minutes after treatment) decreased by 6.4 times and amounted to 2238 CFU/m³. There is also a sharp decrease in the number of flies in production facilities treated with drug «Averdez». Undoubtedly, this helps to reduce the negative pressure of the conditionally pathogenic microflora and insects on the physiological state of quail and increase the average daily gain. The gradual return of the sanitary-microbiological state of the air environment of the poultry house to its initial state occurs within 2.5-3.0 weeks after treatment.

Thus, the use of drug «Averdez» in the presence of poultry for disinfection of premises reduces the total microbial number in the poultry house, positively affects such an integral indicator of the realization of genetic potential as weight gain. The drug does not have a negative effect on the body as a whole and on the respiratory tract (lungs, trachea), which is confirmed by histological studies conducted on 3, 14 and 20 days after treatment.

The drug «Averdez» allows for simultaneous disinsection, disinfection and disaccharidisation, which in turn increases the target effectiveness of measures and reduces economic, labor and time costs.

References

1. Zavarzin I.V., Dzhabarov M.Kh., Kolobov A.V., Mirzaev M.N., Chernoburova E.I., Bobova T.A. 5-O-Succinoylivermectin, a method for its preparation and an antiparasitic agent based on it // Patent RU No. 2453553 C1, publ. 06.20.2012.

УДК 664: 637.5 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-414-416

ИННОВАЦИОННАЯ КОМПЛЕКСНАЯ ПИЩЕВАЯ ДОБАВКА «МЕЛАДЕЗ» ДЛЯ МЯСОПЕРЕРАБАТЫВАЮЩИХ ПРОИЗВОДСТВ

Мирзаева К.М.¹, Зверьков Д.А.², Мирзаев М.Н.²

¹ Общество с ограниченной ответственностью Научно-производственное объединение «ЭКОБИОВЕТ», Москва, Россия 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д.23, стр.8
email: wagasi@mail.ru

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина», Москва, Россия 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д.23

Работа посвящена изучению эффективности комплексной пищевой добавки «Меладез», применяемой с целью продления срока хранения продукции. Показано, что добавка обеспечивает хранение тушек перепелов без изменения органолептических и санитарно-микробиологических показателей в течение 12-15 суток при 4-6°C в бытовом холодильнике.

Ключевые слова: тушки перепелов, короткоцепочечные жирные кислоты, срок хранения, меланины гречихи, надуксусная кислота (НУК).

Продление срока хранения продуктов без потери их пищевой ценности и органолептических свойств имеет важное экономическое значение и является одной из первостепенных задач мясоперерабатывающих производств.

Предлагаемая работа касается оценки эффективности новой комплексной пищевой добавки «Меладез» (средство для внешней обработки) для мясо- и птицеперерабатывающих производств, применяемой с целью продления срока хранения готовой продукции, путем предотвращения контаминации её вредными микроорганизмами при производстве и хранении.

Инновационный состав компонентов комплексной пищевой добавки «Меладез» обеспечивает синергетический эффект действующих веществ, гарантируя высокую эффективность и широкий спектр применения средства. Добавка содержит в качестве действующих веществ короткоцепочечные жирные кислоты, обладающие высокой биоцидной активностью в отношении широкого круга грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей и плесневых грибов. Входящие в состав средства меланины гречихи оказывают антимикробный эффект, обусловленный разрушительным электрохимическим воздействием на оболочку клеток микроорганизмов. В тоже время меланины гречихи и лимонная кислота, которые входят в состав пищевой добавки «Меладез», являются мощными антиоксидантами и обеспечивают резкое снижение процесса прогоркания жиров [1].

Исследования по оценке эффективности средства проводились на тушках перепелов (КФХ «Сказка», Рязанская область), которые обрабатывались добавкой «Меладез» путем окунания в рабочий раствор. Для сравнения были использовано известное средство на основе перекиси водорода и надуксусной кислоты (НУК), применяемое в технологическом процессе для антимикробной обработки тушек птицы.

Заключение об эффективности исследуемых средств делали в процессе хранения тушек путем фиксации органолептических и бактериологических показателей. Основные показатели качества тушек оценивали в соответствии с требованиями к качеству и безопасности туш убойных животных (СанПин 2.3.3.1078.01) [2].

В соответствии с полученными данными, срок хранения тушек перепелов при обработке средством на основе перекиси водорода и НУК составляет до 5-6 суток, а пищевая добавка «Меладез» обеспечивает срок хранения до 12 - 15 суток. В тоже время при обработке средствами на основе перекиси водорода и надуксусной кислоты (НУК) отмечалось изменение цвета поверхности тушек - их цвет становится более бледным. Применение добавки «Меладез» не влияло на органолептические показатели мяса птицы.

Таким образом, комплексная пищевая добавка «Меладез» эффективно продлевает срок хранения тушек птицы за счет предотвращения контаминации их вредной микрофлорой и гарантирует ее безопасность, исключает возможность окисления жиров при хранении и не оказывает негативного влияния на органолептические показатели продукции. Добавка экологически безопасна, не является консервантом и антибиотиком, не содержит ферментов, ГМО, канцерогенов и безвредна для людей, животных и окружающей среды.

Литература

1. Мирзаева К.М., Мельницкая Т.И., Мирзаев М.Н., Бессарабова Е.В., Молокова Е.И. Протекторные свойства растительных меланинов (Мелавит) // *Материалы VIII международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития»*. М., 2015. - Ч.2. - С. 151-152.
2. (СанПин 2.3.3.1078.01), *Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов, МД «Инструкция по санитарно-микробиологическому контролю тушек птицы, птицепродуктов, яиц на птицеводческих и птицеперерабатывающих предприятиях»*, Минсельхоз РФ, 1992 г.).

UDC 664: 637.5 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-414-416

INNOVATIONAL COMPLEX FOOD ADDITIVE «MELADEZ» FOR MEAT PROCESSING PRODUCTS

Mirzaeva K.M.¹, Zverkov D.A.², Mirzaev M.N.²

¹ Limited Liability Company Scientific Production Association «ECOBIOVET», Moscow, Russia
109472, Moscow, Academician Skryabin St., 23 bldg. 8
email: wagasi@mail.ru

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin",
109472, Moscow, Academician Skryabin St., 23

The work is devoted to the study of the effectiveness of the complex food additive «Meladez» used to extend the shelf life of products. It is shown that the additive provides storage of quail carcasses without changing organoleptic and sanitary-microbiological parameters for 12-15 days at 4-6°C in a domestic refrigerator.

Key words: quail carcasses, short chain fatty acids, shelf life, buckwheat melanin, peracetic acid (NAA).

Extending the shelf life of products without losing their nutritional value and organoleptic properties is of great economic importance and is one of the primary tasks of meat processing industries.

The proposed work concerns the evaluation of the effectiveness of the new integrated food additive «Meladez» (an external processing agent) for meat and poultry processing plants, which is used to extend the shelf life of finished products by preventing contamination by harmful microorganisms during production and storage.

The innovative composition of the components of the complex food additive «Meladez» provides a synergistic effect of active ingredients, guaranteeing high efficiency and a wide range of application of the product. The additive contains short-chain fatty acids as active substances, which have high biocidal activity against a wide range of gram-positive and gram-negative bacteria, yeast and molds. The buckwheat melanins included in the composition have an antimicrobial effect due to the destructive electrochemical effect on the cell membrane of microorganisms. At the same time, buckwheat melanins and citric acid, which are part of the food supplement «Meladez», are powerful antioxidants and provide a sharp reduction in the process of rancidity of fats [1].

Studies on evaluating the effectiveness of the drug were carried out on quail carcasses (Peasant Farm, Ryazan Region), which were processed with the additive «Meladez» by dipping into the working solution. For comparison, we used the well-known tool based on hydrogen peroxide and peracetic acid (NAA), which is used in the process for antimicrobial treatment of poultry carcasses.

The conclusion about the effectiveness of the studied funds was made in the process of storing carcasses by fixing organoleptic and bacteriological indicators. The main indicators of carcass quality were evaluated in accordance with the requirements for the quality and safety of carcasses of slaughtered animals (SanPin 2.3.3.1078.01) [2].

In accordance with the data obtained, the shelf life of quail carcasses when processed with hydrogen peroxide and NUK based products is up to 5-6 days, and the food supplement «Meladez» provides a shelf life of up to 12-15 days.

At the same time, when processing with means based on hydrogen peroxide and peracetic acid (NAA), a change in the surface color of carcasses was noted - their color becomes paler. The use of «Meladez» did not affect the organoleptic characteristics of poultry meat.

Thus, the integrated food supplement «Meladez» effectively prolongs the shelf life of poultry carcasses by preventing contamination with harmful microflora and guarantees its safety, eliminates the possibility of fat oxidation during storage and does not negatively affect the organoleptic characteristics of products. The supplement is

environmentally friendly, not a preservative and antibiotic, does not contain enzymes, GMOs, carcinogens and is harmless to humans, animals and the environment.

References

1. Mirzaeva K.M., Melnitskaya T.I., Mirzaev M.N., Bessarabova E.V., Molokova E.I. Protector properties of plant melanins (Melavit) // *Proceedings of the VIII International Congress "Biotechnology: state and development prospects."* M., 2015.-P.2.-С.151-152.
2. (SanPin 2.3.3.1078.01), *Hygienic requirements for safety and nutritional value of food products, MD "Instructions for the sanitary-microbiological control of poultry carcasses, poultry products, eggs in poultry and poultry processing enterprises", Ministry of Agriculture of the Russian Federation, 1992).*

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-416-418

НОВЫЙ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПИЩЕВОЙ ИНГРЕДИЕНТ АДАПТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ

Н.А.Петров, С.Н.Зорин, Ю.С.Сидорова, В.К.Мазо

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи", Россия
109240, Москва, Устьинский проезд, 2/14
e-mail: petrov-nikita-y@mail.ru, +79037948714

Представлен технологический подход к получению функционального пищевого ингредиента адаптогенного действия, включающий стадии ультрафильтрации, концентрирования путем обратного осмоса и очистки через хроматографическую колонку.

Ключевые слова: Шпинат, фитостероиды, полифенолы ультрафильтрация, обратный осмос

Подверженность современного общества психоземotionalному стрессу, синдрому хронической усталости, повышенным физическим и умственным нагрузкам определяет перспективность разработки технологий получения функциональных пищевых ингредиентов (ФПИ) адаптогенного действия для включения в состав соответствующих специализированных продуктов. Особый интерес представляют практически не изученные вопросы возможного синергизма в проявлении адаптогенных эффектов, реализующихся при сочетании фитостероидов и полифенолов - соединений с выраженным антиоксидантным действием. Одним из наиболее широко изучаемых фитостероидов является - 20-гидроксистерон (20E), содержащийся в некоторых видах дикорастущих и пищевых растений [1, 2]. Перспективным пищевым растением, содержащим комплексы стероидов и полифенолов, является шпинат огородный (*Spinacia oleracea* L.).

Целью данного исследования является разработка технологии получения из листьев шпината ФПИ, с высоким содержанием 20E и полифенолов.

В качестве исходного сырья использованы свежие листья шпината огородного (*Spinacia oleracea* L.). Содержание влаги в листьях сырого шпината составляло 92%. Листья шпината были лиофильно высушены на установке ЛС-500 (ПРОИНТЕХ, РФ), измельчались на лабораторном блендере Fimar(Fimar FRI, Италия) до порошкообразного состояния и подвергались экстракции при перемешивании с экстрагентом в соотношении 1г/39мл в течение 60 минут при температуре 25°C. В качестве экстрагентов использовали дистиллированную воду, 20 и 40 % этиловый спирт. Полученную смесь центрифугировали в течение 30 минут при 4000 об/мин (центрифуга Beckman J-6B, AL-TAR, США), отбирали супернатант. Далее проводили ультрафильтрацию супернатанта через мембрану с диаметром пор 10кДа (лабораторная установка для микро- и ультрафильтрации на базе фильтродержателя АСФ-018, Владисарт, РФ), полученную низкомолекулярную фракцию подвергали концентрированию на установке обратного осмоса УРФ-1812 (Владисарт, РФ). Остаточные количества спирта (в случае спиртовой экстракции) удаляли при 55°C на роторном испарителе ИР1МЗ (ОАО «Химлаборприбор», РФ). Щавелевую кислоту из продукта удаляли методом препаративной жидкостной хроматографии на колонке с сорбентом С18 (4,0*9,0 см).

Определение содержания щавелевой кислоты на различных стадиях получения фитостероидсодержащего экстракта из листьев шпината проводили методом перманганатометрического титрования [3] с некоторыми модификациями.

Содержание 20E в образцах определяли методом ВЭЖХ с использованием хроматографа Agilent Technologies 1100 (AgilentTechnologies, США) с масс-детектором Agilent Technologies 6410 на колонке Agilent Technologies

Poroshell 120 EC-C18 3,0*50 мм, 2,7 мкм при градиентном элюировании в системе 0,1% муравьиная кислота/ацетонитрил. В качестве образца сравнения использовали стандартный образец 20E (Sigma, 98%) [4].

Суммарное содержание флавоноидов определяли методом ВЭЖХ (хроматограф Ultimate 3000 (Dionex, США) с диодно-матричным спектрофотометрическим детектором и тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором TSQEndura (ThermoFisherScientific, США)) на колонке PhenomenexLunaC18 150*4.6 мм (5 μm) в градиенте вода/ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты. Обработка данных осуществлялась с помощью программного обеспечения ThermoXcalibur 3.0.63 [5].

При экстракции дистиллированной водой содержание 20E и суммарных флавоноидов в конечном продукте составило 14,7±1,5 мг/г и 410±40 мг/г, соответственно. Флавоноиды сконцентрированы в 34,7 раз и фитостероиды (20E) в 30,7 раз. При экстракции 20% этанолом содержание флавоноидов в составе ФПИ составило 401±39 мг/г и фитостероидов (20E) 11,3±1,1 мг/г. Флавоноиды сконцентрированы в 31,8 раз и фитостероиды (20E) в 26,8 раз. При экстракции 40% этанолом содержание флавоноидов в составе продукта составило 403±40 мг/г и фитостероидов (20E) 12,1±1,2 мг/г. Флавоноиды сконцентрированы в 29,5 раз и фитостероиды (20E) в 28,3 раз.

Содержание щавелевой кислоты в продуктах достоверно не определялось (менее 0,02 вес.%).

Таким образом, высокое содержание 20E и полифенолов в получаемых продуктах сочетается с предельно низким содержанием щавелевой кислоты, что определяет перспективы дальнейшего использования разрабатываемой технологии получения ФПИ для включения в состав функциональных пищевых продуктов адаптогенного действия.

Финансирование: Работа проведена за счет средств гранта РНФ №19-16-00107 «Новые функциональные пищевые ингредиенты адаптогенного действия, предназначенные для увеличения работоспособности организма человека и повышения его когнитивного потенциала».

Литература

1. Cao V.D., Riu K.Z., Boo K.H. Biosynthesis and accumulation of 20-hydroxyecdysone in individual male and female spinach plants during the reproductive stage // *Plant Physiol Biochem.* 2018. Vol. 129. P. 394-399.
2. Матаев С.И., Володин В.В. Экдистероидсодержащие растения - источники новых адаптогенов // *Вестник Биотехнологии.* - 2011.- Т.7.-№2.- С.52-59.
3. Сусленикова В.М., Киселева Е.К. Руководство по приготовлению титрованных растворов. – М.: Химия, 1967. - С.144.
4. Yoo S.R., Jeong S.J., Lee N.R., Shin H.K., Seo C.S. Quantification Analysis and In Vitro Anti-Inflammatory Effects of 20-Hydroxyecdysone, Momordin Ic, and Oleanolic Acid from the Fructus of *Kochia scoparia* // *Pharmacogn Mag.* 2017. Vol. 13. № 51. P. 339-344.
5. Park J.S., Kim I.S., Shaheed Ur Rehman, Na C.S., Yoo H.H. HPLC Determination of Bioactive Flavonoids in *Hovenia dulcis* Fruit Extracts // *J Chromatogr Sci.* 2016.Vol. 54. № 2. P. 130-135.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-416-418

NEW FUNCTIONAL FOOD INGREDIENT FROM SPINACH LEAVES

N.Petrov, S.Zorin, Y.Sidorova, V.Mazo

Federal state budgetary organization of science "Federal research center of nutrition, biotechnology and food safety" Russia, 109240, Moscow, Ustiinsky, 2/14

The technological approach is presented for the production of functional food ingredient with adaptogenic properties including the following stages: ultrafiltration, concentration via reverse osmos and chromatography.

Key words: Spinach, phytoecdysteroids, polyphenols, ultrafiltration, reverse osmos

The exposure of modern society to psychological stress, chronic fatigue syndrome, increased physical and mental load determines the prospects of technology development for production of functional food ingredients (FFI) with adaptogenic action for the inclusion into the composition of proper specialized products. The possible synergism is of special interest between phytoecdysteroids and polyphenols – substances with strong antioxidant effects – regarding to their potentially combined adaptogenic effects. One of the widely studied phytoecdysteroids is 20-hydroxyecdysone (20E), the component of some medicinal and food plants [1, 2]. Spinach (*Spinacia oleracea* L.) is prospective food source of polyphenols and phytoecdysteroids.

The aim of this study was to develop the technology for production of FFI from spinach with high content of 20E and polyphenols.

Fresh spinach leaves were used as raw material. The humidity of leaves was 92%. Spinach was freeze-dried using LS500 apparatus (Prointech, Russia), powdered with laboratory blender Fimar (Fimar FRI, Italy). The powder was mixed with extragent in the ratio 1:39 during 60 min at 25°C. Distilled water, 20 and 40% ethanol were used as extragents. The mixture was centrifuged (centrifuge Beckman J-6B, AL-TAR, USA) during 30 min at 4000 rpm, the supernatant was decanted. After, the supernatant was ultrafiltered through the 10 kDa membrane (ultrafiltration system ASF-018, Vladisart, Russia). Obtained low-molecular fraction was concentrated using reverse osmos apparatus URF-1812 (Vladisart, Russia). Remaining ethanol was deleted on the rotor evaporator IR1M3 (Himlaborpribor, Russia). Oxalic acid was deleted from FFI using chromatographic column with C18 sorbent (4.0*9.0 cm).

The oxalic acid content was determined on every production stage according to permanganometric titration method [3].

The 20E content in the samples was determined by HPLC with the use of chromatograph Agilent Technologies 1100 (Agilent Technologies, USA) with mass-detector Agilent Technologies 6410 and column Agilent Technologies Poroshell 120 EC-C18 (3.0*50 mm, 2.7 µm at gradient elution in the system 0.1% formic acid/acetonitril). The standard sample of 20E (98%, Sigma, USA) was used as comparison sample [4].

The total flavonoids content was determined by HPLC (chromatograph Ultimate 3000 (Dionex, USA) with diode array spectrophotometric detector and triple quadrupole mass spectrometric detector TSQ Endura (Thermo Fisher Scientific, USA)) using the column Phenomenex Luna C18 150*4.6 mm (5µm) in the gradient water/acetonitril with 0.1% formic acid. The analysis of data was conducted using Thermo Xcalibur 3.0.63 software [5].

The content of 20E and total flavonoids at water extraction was 14.7±1.5 mg/g and 410±40 mg/g, respectively. Flavonoids were concentrated 34.7 times and 20E 30.7 times. The content of 20E and total flavonoids at 20% ethanol extraction was 11.3±1.1 mg/g and 401±39 mg/g, respectively. Flavonoids were concentrated 31.8 times and 20E 26.8 times. The content of 20E and total flavonoids at 40% ethanol extraction was 12.1±1.2 mg/g and 403±40 mg/g, respectively. Flavonoids were concentrated 29.5 times, 20E 28.3 times.

The content of oxalic acid was less than method sensibility (less than 0.02%).

Thus, high content of 20E and polyphenols in produced FFI conjoin low content of oxalic acid. This determines the prospects for the usage of developed technology for production of FFI for inclusion into the functional food products with adaptogenic action.

Grant: This work was supported by Russian Scientific Foundation, project number 19-16-00107.

References

1. Cao V.D., Riu K.Z., Boo K.H. Biosynthesis and accumulation of 20-hydroxyecdysone in individual male and female spinach plants during the reproductive stage // *Plant Physiol Biochem.* 2018. Vol. 129. P. 394-399.
2. Mataev S.I., Volodin V.V. Ecdysteroid containing plants – sources of new adaptogens // *Vestnik Biotechnologii.* 2011. Vol.7. №2. P.52-59.
3. Suslennikova V.M., Kiseleva E.K. Guidelines for preparing titrated solutions. – Moscow: Himiya, 1967. – P.144.
4. Yoo S.R., Jeong S.J., Lee N.R., Shin H.K., Seo C.S. Quantification Analysis and In Vitro Anti-Inflammatory Effects of 20-Hydroxyecdysone, Momordin Ic, and Oleanolic Acid from the Fructus of *Kochia scoparia* // *Pharmacogn Mag.* 2017. Vol. 13. № 51. P. 339-344.
5. Park J.S., Kim I.S., Shaheed Ur Rehman, Na C.S., Yoo H.H. HPLC Determination of Bioactive Flavonoids in *Hovenia dulcis* Fruit Extracts // *J Chromatogr Sci.* 2016. Vol. 54. № 2. P. 130-135.

УДК 579.672 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-418-420

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАПИТКОВ НА ОСНОВЕ КЛУБНЕЙ ТОПИНАМБУРА

Плотникова В.Е., Шевченко В.А., Кареткин Б.А., Шакир И.В., Панфилов В.И.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия
125047, Миусская пл., д 9
e-mail: valia.plotnikova2011@yandex.ru

Исследован рост лактобацилл на экстрактах клубней топинамбура и их стабильность при последующем хранении. Для оценки полученных результатов применяли стандартный и модифицированный метод определения численности. Установлено достоверное различие в полученных результатах, связанное, по всей вероятности, с разрушением агломератов в результате дополнительной обработки.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, фосфатный буфер, клубни топинамбура, функциональные продукты.

Пробиотики – это «живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах приносят пользу организму хозяина» [1]. Традиционно основой широкого ассортимента пробиотических продуктов питания было молоко. Однако сейчас напитки, не содержащие молочных компонентов, представляют собой один из крупнейших секторов на рынке [2, 3]. Топинамбур – клубненосное растение, обладающее высокой питательной ценностью [4, 5].

Цель исследования – изучение влияния растительного субстрата на рост и стабильность молочнокислых микроорганизмов.

В исследовании использовали штаммы бактерий рода *Lactobacillus*, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ). В качестве источника питательных веществ использовали измельченные клубни топинамбура (гидромодуль 10). Определение численности бактерий осуществляли методом последовательных десятикратных разведений с высевом на плотную среду MRS. Дополнительно (модифицированный метод) перед высевом проводили обработку суспензии стерильным фосфатным буфером.

Во всех образцах выявлены высокая скорость роста и интенсивное снижение pH среды. Также наблюдали разницу между численностью лактобактерий, определенной по стандартной и модифицированной методике в среднем в 7 раз. С применением дисперсионного анализа установлено, что в большинстве случаев различия между результатами были достоверны.

Численность жизнеспособных клеток после 28 суток хранения, определенная с применением модифицированного метода, была не ниже 8 log (КОЕ/мл), а стандартного – не ниже 7,5 log (КОЕ/мл).

Модифицированный метод может быть полезным инструментом для проведения контроля качества пищевых продуктов, содержащих живые пробиотические микроорганизмы, однако, требуется проведения дальнейших исследований. Лактобактерии характеризуются высокими показателями роста на экстрактах клубней топинамбура без предварительной обработки и внесения добавок.

Литература

1. FAO/WHO. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on guidelines for the evaluation of probiotics in food. – 2002.
2. Buruleanu L. C. et al. Fermentation of Vegetable Juices by *Lactobacillus Acidophilus* LA-5 // *Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. – InTech Rijeka, Croatia, 2013. – С. 173-194.
3. Granato D. et al. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products // *Comprehensive reviews in food science and food safety*. – 2010. – Т. 9. – № 3. – С. 292-302.
4. Jovanovic-Malinovska R., Kuzmanova S., Winkelhausen E. Oligosaccharide profile in fruits and vegetables as sources of prebiotics and functional foods // *International journal of food properties*. – 2014. – Т. 17. – № 5. – С. 949-965.
5. Slavin J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits // *Nutrients*. – 2013. – Т. 5. – № 4. – С. 1417-1435.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-418-420

THE STUDY ON PROBIOTIC FUNCTIONAL BEVERAGES WITH JERUSALEM ARTICHOKE TUBERS

Plotnikova V.E., Shevchenko V.A., Karetkin B.A., Shakir I.V., Panfilov V.I.

Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow Russia
125047, Miuskaya sq., 9
e-mail: valia.plotnikova2011@yandex.ru

The growth of lactobacilli in extracts of Jerusalem artichoke tubers and stability of the cultures during subsequent storage were studied. To assess the results, a standard and modified method for determining the number of lactobacilli was used. A significant difference was established in the obtained results, which are most likely associated with the destruction of agglomerates as the result of additional processing.

Key words: lactic acid bacteria, phosphate buffer, Jerusalem artichoke tubers, functional products.

Probiotics are “living microorganisms that, when administered in adequate amounts, benefit the host organism” [1]. Traditionally, the basis of a wide range of probiotic foods has been milk. However, now drinks that do not contain dairy components represent one of the largest sectors on the market [2, 3]. Jerusalem artichoke is a tuberous plant with high nutritional value [4, 5].

The aim of the work is to study the effect of plant substrate on the growth and stability of lactic acid bacteria.

The study used strains of bacteria of the genus *Lactobacillus*, obtained from the All-Russian collection of industrial microorganisms (VKPM). Shredded Jerusalem artichoke tubers (solid:water ratio 1:10) were used as a

source of nutrients in the experimental medium. Counting of microorganisms was carried out by 10-fold dilutions technique with plating on MRS medium. Additionally (modified method) before plating, the suspension was treated with sterile phosphate buffer.

All samples showed a high growth rate and an intense decrease in pH. We also observed a difference between lactobacilli count, determined by the standard and modified methods on average by 7 times.

To confirm the stability of lactic acid bacteria in the extract after fermentation, we studied the dynamics of their numbers during storage for 28 days at 2–6 °C. Using analysis of variance, it was found that in most cases, the differences between the results obtained by the standard and modified methods were reliable for an error of not more than 0.025, which is an acceptable level of confidence in biological studies.

The number of viable cells after 28 days of storage was upper then 8 log (CFU / ml) according the modified method, and upper than 7.5 log (CFU / ml).

The modified method can be a useful tool for quantification of food products containing live probiotic microorganisms. However, further researches are required in this direction. Lactobacillus are characterized by high growth rates on extracts of Jerusalem artichoke tubers, even without preliminary treatment, as well as without the addition of additives.

References

1. FAO/WHO. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on guidelines for the evaluation of probiotics in food. – 2002.
2. Burleanu L. C. et al. Fermentation of Vegetable Juices by *Lactobacillus Acidophilus* LA-5 // *Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. – InTech Rijeka, Croatia, 2013. – С. 173-194.
3. Granato D. et al. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products // *Comprehensive reviews in food science and food safety*. – 2010. – Т. 9. – № 3. – С. 292-302.
4. Jovanovic-Malinovska R., Kuzmanova S., Winkelhausen E. Oligosaccharide profile in fruits and vegetables as sources of prebiotics and functional foods // *International journal of food properties*. – 2014. – Т. 17. – № 5. – С. 949-965.
5. Slavin J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits // *Nutrients*. – 2013. – Т. 5. – № 4. – С. 1417-1435.

УДК: 577.1; 577.1.08 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-420-422

РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ТРОПОНИН I И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ

Д.С.Поправко

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА - Российский технологический университет», Москва, Россия
Россия, 119454, Москва, проспект Вернадского, 78, e-mail: dspopravko@mitht.ru, +79851807203

Разработана методика иммунохроматографического анализа тропонина I - маркера мышечных тканей млекопитающих, для оценки состава мясных продуктов. Пробоподготовка включала экстракцию тропонина I 0,5 М KCl в сочетании с термообработкой. Показана эффективность методики для выявления содержания в мясных продуктах мышечных тканей млекопитающих.

Ключевые слова: мясо, мясопродукты; иммунохроматографический анализ, тропонин I.

Эффективным средством характеристики состава и качества продуктов питания является иммунохроматографический анализ (ИХА), который позволяет быстро выявить присутствие и оценить содержание разных видов сырья или контаминант непосредственно в производственных условиях, без привлечения дополнительного оборудования. Благодаря предварительному нанесению всех необходимых для анализа реагентов на мембраны тест-полоски для проведения анализа достаточно контакта этой тест-полоски с пробой, а для характеристики результатов – оценки наличия и интенсивности окрашивания определенных зон тест-полоски. Применительно к мясопродуктам разработки ИХА ограничиваются контролем уровня ветпрепаратов и выявлением запрещенных компонентов (например, в халяльной пище). Целью проведенного исследования была разработка тест-системы для оценки содержания в мясопродуктах мышечных тканей млекопитающих с целью сопоставления получаемых величин с заявленным составом продуктов.

В качестве биомаркера, детектируемого разрабатываемой тест-системой, была выбрана скелетная

изоформа тропонина I (TnI). Данный выбор обусловлен ее специфичностью для мышечных тканей млекопитающих и термостабильностью. Разработка ИХА включала получение и характеристику нанодисперсных маркеров – золотых наночастиц, их конъюгирование со специфическими антителами к TnI, выбор условий иммобилизации иммунореагентов на мембранах тест-полоски и протокола тестирования, обеспечивающих низкий предел обнаружения TnI и отсутствие неспецифических взаимодействий. Размерные параметры наночастиц и конъюгатов характеризовали методом просвечивающей электронной микроскопии, степень сохранения антигенсвязывающих свойств при иммобилизации антител – методом иммуноферментного анализа. Предложенная пробоподготовка для тестирования мясного сырья включала экстракцию 0,5 М KCl в сочетании с быстрой высокотемпературной термообработкой (3 мин, 100°C), разрушающей структуру термолабильных белков и их комплексов и обеспечивающей быстрое высвобождение TnI. Для тестирования мясных продуктов, прошедших технологическую обработку, разработан снижающий влияние матрикса комплексный буфер, содержащий 0.5 М KCl, 0.04 М NaNO₂ и 0.01 М сахарозы.

Разработанная методика ИХА характеризуется пределом обнаружения TnI 30 нг/мл при диапазоне определяемых концентраций 62-645 нг/мл. Достигнутая высокая чувствительность позволяет использовать для тестирования значительные (до 100раз) разведения получаемых экстрактов. Специфичность используемых антител позволяет отличать продукты из мяса млекопитающих (говядина, свинина, баранина) от продуктов из мяса птиц (курица, индейка) и вегетарианских продуктов, имитирующих свойства мяса. Достоверность получаемых результатов тестирования подтверждена в ходе апробации ИХА для характеристики проб мяса и мясopодуKтов (колбаса). Разработанная методика представляется эффективным средством контроля аутентичности и качества мясных продуктов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта 19-16-00108 Российского научного фонда.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-420-422

DEVELOPMENT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST-SYSTEM FOR TROPONIN I AND ITS APPLICATION FOR CONTROL OF MEAT PRODUCTS

D.Popravko

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "MIREA - Russian Technological University",
Moscow, Russia
Russia, 119454, Moscow, Vernadsky prospekt, 78

A method for immunochromatographic analysis of troponin I, a marker of muscle tissue in mammals, was proposed for evaluation of the meat products composition. The procedure of sample preparation included extraction by 0.5 M KCl combined with heat treatment. The efficiency of this method in the assessment of mammalian muscle tissues in various meat products was demonstrated.

Key words: meat, meat products, immunochromatographic analysis, troponin I.

An effective means of characterizing the composition and quality of food products is immunochromatographic analysis (ICA), which allows identifying the presence and evaluating the content of different types of raw materials or contaminants directly at the place of manufacturing, without involving additional equipment. Due to preliminary application of all the reagents to membranes of the test strip, the contact of this test strip with the sample is sufficient for analysis, and estimation of staining intensity of certain areas of the test strip is enough to characterize the results. The existing methods of ICA for meat products can only control levels of veterinary drugs and identify prohibited components (for example, in halal food). The aim of our study was to develop a test system for assessing the content of mammalian muscle tissue in meat products in order to compare the obtained values with the declared composition of the products.

The skeletal muscle protein troponin I (TnI) has been used as thermally stable and species-specific biomarker of mammalian muscle tissues. The development of the ICA included synthesis and characterization of conjugates between specific antibodies and colloidal gold, choice of regimes for immobilization of immunoreagents on the test strip membranes and finding the assay conditions for the lowest detection limit of TnI and the absence of nonspecific interactions. Dimensional parameters of nanoparticles and conjugates were characterized by transmission electron microscopy, the degree of preservation of antigen-binding properties during immobilization of antibodies was determined by enzyme immunoassay. The procedure of sample preparation included extraction by 0.5 M KCl combined with heat treatment (3 min, 100°C). To reduce the influence of the matrix of technological processed meat products a complex buffer containing 0.5 M KCl, 0.04 M NaNO₂ and 0.01 M sucrose has been developed.

The technique was characterized by TnI detection limit equal to 30 ng/ml with quantifiable concentrations ranging from 62 to 645 ng/ml. The achieved high sensitivity provides possibility to use significant (up to 100 times) dilutions of the obtained extracts for the testing. The specificity of the used antibodies allows distinguishing products from mammalian meat (beef, pork, and lamb) from poultry products (chicken, turkey, and duck). The developed protocol was successfully applied to characterize meat and meat-based products, including various kinds of sausages. The developed technique may be considered as an effective means of controlling the authenticity and quality of meat products.

This investigation was financially supported by the Russian Scientific Foundation (project No 19-16-00108).

УДК 579.6 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-422-423

НОВЫЙ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ АГРЕГАТООБРАЗУЮЩИЙ ПРОДУЦЕНТ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА

Е.Р. Митина, А.Б. Пшеничникова

МИРЭА - Российский технологический университет, Москва, Россия
119454, г. Москва, Проспект Вернадского, д. 78
e-mail: a_pshenichnikova@mail.ru

Изучен рост и накопление каротиноидного пигмента и поли-3-гидроксибутирата новым штаммом розовоокрашенной факультативной метилотрофной бактерии *Methylobacterium extorquens* LP в суспензионной культуре и в составе клеточных агрегатов. Определены параметры, способствующие агрегации клеток и образованию поли-3-гидроксибутирата.

Ключевые слова: розовоокрашенные факультативные метилотрофные бактерии, клеточная агрегация, поли-3-гидроксибутират.

Розовоокрашенные факультативные метилотрофные бактерии (РОФМ), представленные родами *Methylobacterium* и *Methylobacterium*, обладают высоким биотехнологическим потенциалом, являются продуцентами биоразлагаемых термопластиков – полигидроксиалканоатов, самым распространенным из которых является поли-3-гидроксибутират (ПГБ). Также РОФМ накапливают каротиноидные пигменты – красители и антиоксиданты, применяемые в пищевой промышленности и в качестве кормовой добавки в аквакультуре. Способность этих бактерий использовать в качестве единственного источника углерода и энергии доступный метанол позволяют рассматривать их в качестве перспективных продуцентов полигидроксиалканоатов и каротиноидных пигментов.

В настоящей работе использовали новый штамм *Methylobacterium extorquens* LP, характеризующийся биосинтезом каротиноидного пигмента с максимумами в электронном спектре поглощения при 461, 493 и 530 нм в метаноле и ПГБ с температурой плавления 176 °С. Особенностью штамма явилось образование клеточных агрегатов в процессе культивирования в жидкой питательной среде. Для идентификации продуктов использовали методы спектрофотометрии и ¹H и ¹³C-ЯМР-спектроскопии.

Культивирование *Methylobacterium extorquens* LP проводили в жидкой питательной минеральной среде Choi в присутствии метанола при 28 °С, pH 7,4 на шейкере при 170 об/мин. Пробы культуральной жидкости разделяли на бумажных фильтрах при атмосферном давлении. Рост в суспензионной культуре и в составе бактериальных агрегатов определяли, измеряя оптическую плотность фильтрата и массу агрегатов на фильтре. Было обнаружено, что ПГБ накапливается преимущественно в составе агрегатов.

Для выделения каротиноидных пигментов и ПГБ из биомассы использовали технологию, включающую два этапа. На первом этапе проводили экстракцию липидов метанолом и дальнейшее выделение каротиноидных пигментов методом препаративной тонкослойной хроматографии. Далее ПГБ экстрагировали из биомассы хлорсодержащими растворителями – дихлорметаном или хлороформом. ПГБ из экстрактов осаждали диэтиловым эфиром. Выходы продуктов составили 0,002 % для каротиноидов и 24 % для ПГБ от сухой массы клеток.

UDK 579.6 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-422-423

NEW BACTERIAL AGGREGATE-FORMING PRODUCER OF POLY-3-HYDROXYBUTYRATE

E.R. Mitina, A.B. Pshenichnikova

MIREA – Russian Technological University, Moscow, Russia
119454, Moscow, Vernadsky avenue, 78
e-mail: a_pshenichnikova@mail.ru

The growth and accumulation of carotenoid pigment and poly-3-hydroxybutyrate by a new strain of pink-colored facultative methylotrophic bacterium *Methylorubrum extorquens* LP in suspension culture and in cell aggregates were studied. The parameters that promote cell aggregation and the formation of poly-3-hydroxybutyrate have been determined.

Key words: pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria, cell aggregation, poly-3-hydroxybutyrate.

Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs), represented by the genera *Methylobacterium* and *Methylorubrum*, have a high biotechnological potential and produce biodegradable thermoplastics – polyhydroxyalkanoates, the most common of which is poly-3-hydroxybutyrate (PHB). Also, PPFMs accumulate carotenoid pigments – dyes and antioxidants used in the food industry and as a feed additive for aquaculture. The ability of these bacteria to use available methanol as the only source of carbon and energy makes it promising producers of polyhydroxyalkanoates and carotenoid pigments.

In this work, we used a new strain *Methylorubrum extorquens* LP, characterized by the biosynthesis of carotenoid pigment with maxima in the electronic absorption spectrum at 461, 493, and 530 nm in methanol and PHB with a melting point of 176 °C. A feature of the strain was the formation of cell aggregates during cultivation in a liquid nutrient medium. The products were identified by spectrophotometry and ¹H and ¹³C NMR spectroscopy.

The cultivation of *Methylorubrum extorquens* LP was carried out in a mineral Choi medium in the presence of methanol at 28 °C, pH 7.4 on a shaker at 170 rpm. The bacterial culture samples were separated on paper filters at atmospheric pressure. Growth in suspension culture and in the aggregated culture was determined by measuring the optical density of the filtrate and the mass of aggregates on the filter. It was found that PHB accumulates mainly in aggregates.

To isolate carotenoid pigments and PHB from biomass, a two-stage technology was used. At the first stage, lipids were extracted with methanol and further isolation of carotenoid pigments by preparative thin-layer chromatography was carried out. Then PHB was extracted from the biomass with chlorine-containing solvents – dichloromethane or chloroform. PHB from the extracts was precipitated with diethyl ether. The product contents were 0.002 % for carotenoids and 24 % for PHB based on dry cell mass.

UDK 637.136:637.146.33:637.344.8 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-423-425

НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В BIOTECHNOLOGII ПЕРЕРАБОТКИ МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДРОЖЖЕЙ

Рябцева С. А.¹, Храмцов А.Г.¹, Шпак М.А.¹, Сазанова С.Н.¹, Ермаков В.А.²

¹ ФГАОУ ВО Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия
355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, 1

² Ставропольский институт кооперации (филиал) БУКЭП, Ставрополь, Россия
355035, г. Ставрополь, ул. Голенева, 36
e-mail: ryabtseva07@mail.ru

Показана возможность применения дрожжей для получения функциональных добавок и продуктов из молочного сырья. Основное внимание уделено биотехнологиям пребиотиков галактоолигосахаридов и лактулозы, а также новых видов пробиотических молочных продуктов.

Ключевые слова: молочное сырье, дрожжи, галактоолигосахариды, лактулоза, пробиотики

Дрожжи, ферментирующие компоненты молочного сырья, используются в производстве кисломолочных

продуктов смешанного брожения, этанола, бета-галактозидаз и других ферментов. К перспективным направлениям применения дрожжей относится получение олигосахаридов-пребиотиков, олигонуклеотидов-усилителей вкуса, олигопептидов-иммуностимуляторов, пробиотических препаратов и продуктов. В СКФУ изучены особенности культивирования различных дрожжей в молочной сыворотке и ее пермеатах для получения лактазы, продуктов гидролиза и трансгликозилирования лактозы, гидролизатов белков и синтеза бета-каротина. Показана возможность интенсификации процессов переработки молочного сырья на основе совместного культивирования дрожжей и молочнокислых микроорганизмов. Например, внесение *Streptococcus thermophilus* после культивирования *Kluyveromyces marxianus* позволяет существенно сократить как время автолиза, так и время синтеза галактоолигосахаридов-пребиотиков [1].

Лактулоза является хорошо изученным и широко применяемым пребиотиком. Преимущества ферментативного синтеза лактулозы по сравнению с традиционными реагентными технологиями обусловлены возможностью проведения процесса в более мягких условиях, высокой специфичностью и биоразлагаемостью ферментов. Для получения лактулозы могут быть использованы β-галактозидазы дрожжевого происхождения, способные не только гидролизовать лактозу, но и осуществлять присоединение образующейся при этом галактозы к добавленной в субстрат фруктозе [2].

Дрожжи *Saccharomyces boulardii* имеют международный статус безопасности и рекомендованы в качестве пробиотика для пищевых продуктов и кормовых добавок. *S. boulardii* обладают устойчивостью к антибиотикам, кислой среде и желчи, антибактериальным и антитоксическим действием, способностью синтезировать витамины группы В, антиоксиданты и другие функциональные ингредиенты. Применение *S. boulardii* позволяет обогатить молочные продукты важными микронутриентами, стабилизировать pH и кислотность, стимулировать рост стартерных культур и обеспечить их выживаемость в неблагоприятных условиях [3]. Дальнейшие научные исследования, направленные на понимание механизмов действия пробиотических дрожжей, их влияния на свойства молочных продуктов, будут основаны на современных методах молекулярной биологии и биоинформатики.

Литература

1. Рябцева С.А., Котова А.А., Скрипнюк А.А. Дрожжи в переработке молочного сырья. Санкт-Петербург: Лань. – 2019 – 120 с.
2. Silvério S. C., Macedo E. A., Teixeira J. A. et al. Biocatalytic Approaches Using Lactulose: End Product Compared with Substrate // *Comprehensive reviews*. – 2016. Vol. 15. – P. 878–896.
3. Рябцева С. А., Сазанова С. Н., Дубинина А.А. *Saccharomyces boulardii* как потенциальные пробиотики для инновационных пищевых продуктов // *Современная наука и инновации*. – 2019. -№2 (26). – С.138-151.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-423-425

NEW DIRECTIONS IN BIOTECHNOLOGY OF DAIRY RAW MATERIALS PROCESSING USING YEAST

Ryabtseva S.A.¹, **Khramtsov A.G.**¹, **Shpak M.A.**¹, **Sazanova S.N.**¹, **Ermakov V.A.**²

¹ FSAEI HE "North-Caucasus Federal University", Stavropol, Russia
355009, Stavropol, st. Pushkin, 1

² Stavropol Institute of Cooperation (branch) BUKER, Stavropol, Russia 355035, Stavropol, st. Goleneva, 36
e-mail: ryabtseva07@mail.ru

The possibility of using yeast to obtain functional additives and products from dairy raw materials is shown. The main attention is paid to biotechnologies of prebiotics galactooligosaccharides and lactulose, as well as new types of probiotic dairy products.

Key words: milk raw materials, yeast, galactooligosaccharides, lactulose, probiotics

Yeast fermenting the components of dairy raw materials is used in the production of fermented milk products of mixed fermentation, ethanol, beta-galactosidases and other enzymes. Promising areas of application of yeast include the preparation of oligosaccharides-prebiotics, oligonucleotides-flavor enhancers, oligopeptides-immunostimulants, probiotic preparations and products. Specialists of NCFU studied the cultivation of various yeasts in whey and its permeates to obtain lactase, products of hydrolysis and transglycosylation of lactose, protein hydrolysates and synthesis of beta-carotene. The possibility of intensifying the processing of milk raw materials based on the cooperative cultivation of yeast and lactic acid microorganisms is shown. For example, the addition of *Streptococcus*

thermophilus after cultivation of *Kluyveromyces marxianus* can significantly reduce both the autolysis time and the synthesis time of prebiotic galactooligosaccharides [1].

Lactulose is a well-studied and widely used prebiotic. The advantages of the enzymatic synthesis of lactulose in comparison with traditional reagent technologies are due to the possibility of carrying out the process under moderate conditions, high specificity and biodegradability of the enzymes. To obtain lactulose, yeast-derived β -galactosidases can be used, which can not only hydrolyze lactose, but also attach the resulting galactose to fructose added to the substrate [2].

Saccharomyces boulardii yeast has international safety status and is recommended as a probiotic for food and feed additives. *S. boulardii* has resistance to antibiotics, acidic environment and bile, antibacterial and antitoxic effects, the ability to synthesize B vitamins, antioxidants and other functional ingredients. The use of *S. boulardii* makes it possible to enrich dairy products with important micronutrients, stabilize pH and acidity, stimulate the growth of starter cultures and ensure their survival under adverse conditions [3]. Further scientific research aimed at understanding the mechanisms of action of probiotic yeast, their influence on the properties of dairy products, will be based on modern methods of molecular biology and bioinformatics.

References

1. Ryabtseva S.A., Kotova A.A., Skripnyuk A.A. *Yeast in the processing of dairy raw materials*. St. Petersburg: LAN. - 2019 - 120 s.
2. Silvério S. C., Macedo E. A., Teixeira J. A. et al. *Biocatalytic Approaches Using Lactulose: End Product Compared with Substrate // Comprehensive reviews*. - 2016. Vol. 15. - P. 878–896.
3. Ryabtseva S. A., Sazanova S. N., Dubinina A. A. *Saccharomyces boulardii as potential probiotics for innovative food products // Modern Science and Innovation*. - 2019.-№2 (26). - S.138-151.

УДК 663.12:602.4 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-425-427

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ НА ОСНОВЕ КОНВЕРСИИ БИОРЕСУРСОВ ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ

**Серба Е.М., Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Погоржельская Н.С.,
Поливановская Д.В., Абрамова И.М.**

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия
111033, Москва, ул. Самокатная, д. 4б, e-mail: serbae@mail.ru

Исследованы структурные изменения дрожжевой клетки *Saccharomyces cerevisiae*, происходящие под действием ферментов с различной субстратной специфичностью и показана возможность получения ферментолитатов с заданным структурно-фракционным составом и функциональными свойствами для создания обогащенных продуктов.

Ключевые слова: микроорганизмы, дрожжи, структурно-фракционный состав, функциональные продукты

Генетические ресурсы микроорганизмов признаны наиболее многочисленными из биоресурсов нашей планеты. В перерабатывающих отраслях промышленности используется незначительная часть микробного генофонда, но она играет важнейшую роль в пищевых технологиях, основанных на биосинтетических и биокаталитических процессах конверсии сельскохозяйственного сырья. Отдельные микроорганизмы – продуценты промышленно значимых метаболитов (ферментов, белка, органических кислот, этанола), способствуют глубокой переработке пищевого сырья, интенсификации производства, повышению выхода и качества целевых продуктов. Микроорганизмы с пробиотическими свойствами используются часто не только как заквасочные культуры, обеспечивающие стабилизацию технологического процесса, формирование консистенции и структуры пищевой продукции, но и в составе функциональных продуктов и ингредиентов, способствующих поддержанию микробиоценоза человека.

Известно, что рост продуктивности животных и птицы сдерживается несбалансированностью их рационов, особенно, по белку и незаменимым аминокислотам, по важнейшим макро- и микроэлементам. Одним из перспективных направлений для устранения существующего дефицита является применение биологически активных добавок, полученных на основе микроорганизмов. Микроорганизмы имеют ряд

существенных преимуществ по сравнению с высокоурожайными растениями и продуктивными сельскохозяйственными животными. Основные преимущества – это высокая скорость роста микроорганизмов; возможность регуляции процессов биосинтеза для получения необходимых целевых метаболитов; перспективы использования остаточной микробной биомассы в качестве субстрата для получения различных биологически активных добавок пищевого и кормового назначения.

Одним из перспективных источников жизненно важных БАВ является биомасса дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, широко применяемых в бродильных производствах.

Цель исследований – установление взаимосвязи биохимического, спектрального и фракционного состава ферментоллизатов дрожжевой биомассы с функциональными свойствами для создания на их основе обогащенных продуктов целевого назначения.

Результаты исследований показали эффективность ферментативных методов обработки дрожжей для повышения биодоступности внутриклеточных компонентов, и в первую очередь, белковых веществ. С помощью электронной микроскопии исследованы структурные изменения дрожжевой клетки, происходящие под действием ферментов с различной субстратной специфичностью и показана возможность получения ферментоллизатов с заданным структурно-фракционным составом и функциональными свойствами.

Работа проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания.

UDC 663.12:602.4 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-425-427

BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF OBTAINING FUNCTIONAL INGREDIENTS BASED ON THE CONVERSION OF FOOD PRODUCTION BIORESOURCES

Serba E.M., Rimareva L.V., Overchenko M.B., Ignatova N.I., Pogorzhelskaya N.S., Polyvanovskaya D.V., Abramova I.M.

*Russian scientific research Institute of food biotechnology - branch of the Federal state budgetary institution of science of Federal research centre of nutrition, biotechnologie and food safety, Moscow, Russia
111033, Moscow, Samokatnaya str., 4B, e-mail: serbae@mail.ru*

Structural changes of the yeast cell *Saccharomyces cerevisiae* that occur under the action of enzymes with different substrate specificity were studied and the possibility of obtaining fermentolizates with a given structural-fractional composition and functional properties to create enriched products was shown.

Key words: microorganisms, yeast, structural and fractional composition, functional products

The genetic resources of microorganisms are recognized as the most numerous of the biological resources of our planet. In the processing industries, an insignificant part of the microbial gene pool is used, but it plays a crucial role in food technologies based on biosynthetic and biocatalytic conversion processes of agricultural raw materials. Separate microorganisms - producers of industrially significant metabolites (enzymes, protein, organic acids, ethanol), contribute to the deep processing of food raw materials, intensification of production, increase the yield and quality of target products. Microorganisms with probiotic properties are often used not only as starter cultures that ensure stabilization of the technological process, the formation of the consistency and structure of food products, but also as part of functional products and ingredients that contribute to the maintenance of human microbiocenosis.

It is known that the increase in the productivity of animals and birds is constrained by the imbalance in their diets, especially for protein and essential amino acids, for the most important macro- and micronutrients. One of the promising directions for eliminating the existing deficit is the use of biologically active additives obtained on the basis of microorganisms. Microorganisms have a number of significant advantages compared with high-yielding plants and productive farm animals. The main advantages are a high growth rate of microorganisms; the ability to regulate biosynthesis processes to obtain the necessary target metabolites; prospects for the use of residual microbial biomass as a substrate for the production of various biologically active additives for food and feed purposes.

One of the promising sources of vital biologically active substances is the biomass of *Saccharomyces cerevisiae* yeast, which is widely used in fermentation plants. The purpose of the research is to establish the relationship of the biochemical, spectral and fractional composition of yeast biomass fermentolysates with functional properties to create enriched products for their intended use on their basis.

The research results showed the effectiveness of enzymatic methods of treating yeast to increase the bioavailability of intracellular components, and primarily protein substances. Using electron microscopy, we

studied the structural changes in the yeast cell that occur under the action of enzymes with different substrate specificity and showed the possibility of producing fermentolysates with a given structural-fractional composition and functional properties.

The work was carried out at the expense of the subsidy for the implementation of the state task.

УДК 612.392.8:613.286:641.05:641.1:641.56 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-427-428

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЯЙЦЕПРОДУКТОВ, ОБОГАЩЕННЫХ ПОЛИФЕНОЛАМИ

Стефанова И.Л., Мазо В.К., Клименкова А.Ю., Кропачева Е.В., Перова И.Б.

«Всероссийский научно-исследовательский институт птицеперерабатывающей промышленности» – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук (ВНИИПП), Московская область, Россия

141552, Московская область, Солнечногорский р-н, рп. Ржавки, строение 1

e-mail: dp.vniipp@mail.ru

Представлены результаты работ по созданию новых функциональных пищевых яйцепродуктов обогащенных полифенолами клюквы. Установлен уровень введения клюквенного сока в яичный белок, обеспечивающий рациональное содержание антоцианинов с целью повышения их биодоступности. Определен профиль сорбируемых антоцианинов. Исследовано влияние температуры нагрева на уровень антоцианинов в функциональном коагулированном яичном белке.

Ключевые слова: функциональные яичные продукты, полифенолы, антоцианины, обогащение

Природные соединения класса полифенолов (ПФ) обладают широким спектром биологической активности. Особенно выделяется среди них группа антоцианов. Результаты многочисленных экспериментальных исследований свидетельствуют о благоприятном корректирующем влиянии растительных экстрактов, содержащих полифенолы, на нарушения углеводного и/или липидного обмена.

Эффективность использования ПФ ограничена их низкой биодоступностью, что делает необходимым получение функциональных пищевых ингредиентов (ФПИ) с высоким содержанием ПФ для разработки специализированной пищевой продукции. Повышение биодоступности полифенолов возможно за счет изменения места их всасывания, добавления к пищевым ингредиентам (создание пищевой матрицы), концентрирования ПФ за счет сорбирования на пищевой матрице. Взаимодействие полифенолов с белками зависит от температуры инкубации и соотношения белок/ПФ.

В связи с этим целью данной работы явилось разработка технологии обогащения пищевой белковой матрицы – коагулированного белка куриного яйца (КБКЯ) ПФ (антоцианинами), сорбируемыми из клюквенного сока (КС).

Исследована экстракция антоцианинов в зависимости от концентрации КС и соотношения белок/сок, используемых при сорбции антоцианинов в процессе кислотного гидролиза при тепловой обработке с целью получения коагулированного белка куриных яиц, обогащенного ПФ (антоцианинами клюквенного сока).

Проведенные исследования показали, что общее содержание антоцианинов (определенное в пересчете на цианидин-3-глюкозид методом рН-дифференциальной спектрофотометрии) в комплексе с коагулированным белком при введении в белок 10; 15 и 20% клюквенного сока 100%-ной концентрации составляет соответственно 3,97; 12,22; 20,39 мг-экв. цианидин-3 глюкозида/100 г, при введении 20 и 40% клюквенного сока 50%-ной концентрации составило соответственно 3,06 и 21,53 мг-экв./100 г. Использование 100%-ного клюквенного сока в количестве, составляющем 25% и выше в смеси белок куриного яйца-клюквенный сок вызывает ухудшение органолептических свойств получаемого ФПИ. Таким образом, рациональным при получении ФПИ является получение функционального коагулированного яичного белка путем теплового нагрева белка куриных яиц в соотношении с 100-ным клюквенным соком 80:20.

Содержание антоцианинов в КБКЯ составляет 20,39 мг-экв./100 г, сорбция 73,8%. Исследование профиля антоцианинов, проведенное методом ВЭЖХ, показало, что профиль индивидуальных антоцианинов в составе ФПИ представлен, в основном, цианидин-3-галактозидом (22,0%), цианидин-3-арабинозидом (19,6%), пеонидин-3-галактозидом (34,0%) и пеонидин-3-арабинозидом (15,2%).

Исследованием температурных режимов коагуляции БКЯ с КС (нагрев до 80°C, 82°C, 84°C, 86°C) установлена температура коагуляции 83±1°C, обеспечивающая лучшее протекание сорбции в процессе гидролиза. Сорбция белком антоцианинов КС составила при этом 16.61, 20.05, 15.97, 10.37 мг-экв/100 г. или 47,2; 58,3; 59,8; 33,6 % соответственно

На основании проведенных исследований разработана технология получения яичного ФПИ, обогащенного ПФ клюквы.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-16-04047).

UDC 612.392.8:613.286:641.05:641.1:641.56 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-427-428

THE NEW TECHNOLOGY OF FUNCTIONAL EGG BASED PRODUCTS ENRICHED WITH POLYPHENOLS

Stefanova I.L., Mazo V.K., Klimenkova A.Yu., Kropacheva E.V., Perova I.B.

*All-Russian Research Institute of Poultry Processing, affiliate of Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Poultry Institute" of Russian Academy of Sciences (ARSRIPI), Moscow Region, Russia
141552 Moscow Region, Solnechnogorsk district, township Rzhavki, Building 1
e-mail: dp.vniipp@mail.ru*

The results of the development of new technology of functional egg based foodstuffs enriched with polyphenols from cranberries are presented. The optimal ratio of cranberry juice to egg albumen was determined providing reasonable concentration of highly bioavailable anthocyanins in the resulting product. The profile of the individual anthocyanins sorbed on the albumen was determined. The influence of incubation temperature on the concentration of anthocyanins sorbed on the coagulated egg albumen was studied.

Key words: Functional egg based foodstuffs, polyphenols, anthocyanins, enrichment.

Natural polyphenolic (PF) compounds and especially anthocyanins are characterized by a wide range of biological effects. Numerous experimental studies have evidenced the beneficial corrective effects of different PF-containing plant extracts on the disturbances of carbohydrate and/or lipid metabolism.

These effects of the PFs are limited by their low bioavailability; therefore, the production of specialized PF-enriched foodstuffs requires preliminary production of functional food ingredients (FFIs) with high concentration and availability of the PFs. The enhancement of the bioavailability can be achieved via the alteration of their absorption site, combination with different food ingredients (food-grade matrices), concentration of the PFs via the sorption on these matrices. The interaction between the PFs and proteins within the matrices can be affected by incubation temperature and protein/PF ratio.

The aim of the study presented was the development of new technology for the enrichment of food-grade protein matrix (coagulated chicken egg albumen, CCEA) with PFs (anthocyanins) via sorption from the cranberry juice (CJ).

The sorption rate of the anthocyanins on CCEA in relation to CJ concentration and CCEA/CJ ratio during the acid hydrolysis and thermal treatment of native egg albumen was studied.

Total concentration of anthocyanins (determined by pH-differential spectrophotometry in cyanidin-3-glucoside equivalents) in the complex with CCEA after incubation of egg albumen with 10, 15, and 20% of 100% CJ was 3.97; 12.22 and 20.39 mEq/100 g, respectively; incubation with 20 and 40% of 50% CJ resulted in total concentration of anthocyanins 3.06 and 21.53 mEq/100 g. Incubation with 100% CJ in amounts above 25% resulted in the deterioration of the sensory properties of the products.

Therefore, optimal albumen/CJ ratio for the production of the FFI (PF-enriched coagulated egg albumen) by thermal treatment of native egg albumen and 100% CJ is 80:20. Concentration of total anthocyanins in the resulting CCEA was 20.39 mEq/100 g, sorption rate 73.8%. The study of the profile of individual anthocyanins in the enriched CCEA by HPLC technique evidenced that the most abundant anthocyanins in the FFI are cyanidin-3-galactoside (22.0%), cyanidin-3-arabinoside (19.6%), peonidin-3-galactoside (34.0%), and peonidin-3-arabinoside (15.2%).

Different incubation temperatures for the coagulation of native egg albumen with CJ were studied (80, 82, 84 and 86°C); the best sorption rate was found with the temperature 83±1°C. Concentration of total CJ anthocyanins in the enriched CCEA with the temperatures studied was 16.61; 20.05; 15.97 and 10.37 mEq/100 g, sorption rate 47.2; 58.3; 59.8 and 33.6%, respectively.

The studies resulted in the development of the technology of egg based FFI enriched with the PFs from cranberries.

The study was financed by Russian Science Foundation, grant 16-16-04047.

УДК 577.112.083 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-429-430

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССИНГА АЛЛЕРГЕНА ЧЕЧЕВИЦЫ LEN C 3 ПРИ ПРИГОТОВЛЕНИИ ПИЩИ И ПЕРЕВАРИВАНИИ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ

Финкина Е.И., Богданов И.В., Мельникова Д.Н., Овчинникова Т.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
e-mail: finkina@mail.ru

Показано, что аллерген чечевицы Len c 3 устойчив в кислой среде желудка человека, но предварительное нагревание приводит к его денатурации, ускорению переваривания ферментами ЖКТ и снижению аллергизирующей способности.

Ключевые слова: липид-транспортирующий белок, аллерген Len c 3, чечевица, устойчивость, переваривание ферментами желудочно-кишечного тракта, специфические IgE

Чечевица является компонентом диетического питания и важным источником белка в детском рационе. В то же время, во многих странах, особенно Средиземноморского бассейна, часто встречается аллергия на чечевицу. Ранее мы выделили липид-транспортирующий белок из семян чечевицы, который был охарактеризован как аллерген Len c 3, вызывающий перекрестную реакцию на основной аллерген персика Pru p 3. В этой работе мы исследовали структурные особенности Len c 3 как пищевого аллергена.

Известно, что устойчивость к действию различных pH, температуры, а также ферментов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в значительной степени определяет сенсibiliзирующую способность белковых аллергенов. Влияние pH и температуры на структуру Len c 3 было исследовано методом КД-спектроскопии. Было показано, что Len c 3 устойчив в кислых условиях. КД-спектры Len c 3 в фосфатном буфере (pH 7,4) и в 150 мМ растворе хлорида натрия (pH 2,5), имитирующем желудочный сок, были идентичными и имели форму, характерную для α -спиральной структуры. С другой стороны, Len c 3 был чувствителен к нагреванию. Денатурация белка происходила при температуре выше 80°C, и структура Len c 3 не восстанавливалась после охлаждения до 20°C. Далее было проведено моделирование переваривания Len c 3 ферментами ЖКТ *in vitro*. Len c 3 был устойчив к перевариванию пепсином в кислой среде, но эффективно расщеплялся при последующем действии смеси трипсина и химотрипсина в основной среде. Предварительное нагревание Len c 3 приводило к незначительному увеличению скорости деградации белка. Переваривание ферментами ЖКТ сопровождалось отщеплением лабильной C-концевой части аллергена Len c 3, не имеющей регулярной вторичной структуры. Предварительно нагретый и переваренный ферментами ЖКТ Len c 3 при проведении ELISA продемонстрировал заметно меньшую способность связывать специфические IgE из сывороток пациентов с аллергией. Таким образом, Len c 3 устойчив в кислой среде желудка человека, но предварительное нагревание аллергена приводит к его денатурации, ускорению переваривания ферментами ЖКТ и снижению аллергизирующей способности. Поэтому термически обработанная чечевица менее опасна для аллергиков, чем ее свежие проростки.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-45-05002).

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-429-430

SIMULATION OF THE LENTIL ALLERGEN LEN C 3 PROCESSING DURING COOKING AND GASTRODUODENAL DIGESTION

Finkina E.I., Bogdanov I.V., Melnikova D.N., Ovchinnikova T.V.

M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences
Russia, 117997, Moscow, st. Miklukho-Maklaya, 16/10
e-mail: finkina@mail.ru

It is shown that lentil allergen Len c 3 is stable under acidic conditions in the human stomach, but its preliminary heating leads to denaturation, acceleration of gastroduodenal digestion and decrease of allergenic capacity.

Key words: lipid transfer protein, allergen Len c 3, lentil, stability, gastroduodenal digestion, specific IgE

Lentil is a component of the diet and an important food source in the nutrition of children. However, the lentil allergy occurs in many countries especially in the Mediterranean area. Previously we isolated the lipid transfer protein from lentil seeds which was characterized as the allergen Len c 3 cross-reacting with the major peach allergen Pru p 3. In this work, we investigated structural features of Len c 3 as a food allergen.

It is known that pH and heat stability as well as resistance to gastroduodenal digestion largely determine the sensitization capacity of protein allergens. pH and heat stability of Len c 3 were examined by CD spectroscopy. It was shown that Len c 3 was stable under acidic conditions. CD spectra of Len c 3 in the phosphate buffer, pH 7.4, and in the 150 mM sodium chloride buffer, pH 2.5, simulated gastric fluid, were identical and had the shape characteristic of the α -helical structure. On the other hand, Len c 3 was sensitive to heating. Protein denaturation occurred upon heating above 80°C, and the Len c 3 structure did not restore after cooling down to 20°C. Simulation of gastrointestinal digestion of Len c 3 *in vitro* was performed. Len c 3 was not sensitive to pepsin digestion under acidic conditions, but was cleaved efficiently during subsequent digestion by the mixture of trypsin and chymotrypsin. Preheating of Len c 3 led to slight increase in the rate of protein degradation. Gastroduodenal digestion resulted in the cleavage of the Len c 3 labile C-terminal part without regular secondary structure. Heated and digested Len c 3 showed remarkably decreasing capacity to bind specific IgE from sera of allergic patients in ELISA experiments. Thus, Len c 3 does not denature under acidic conditions in the human stomach, but its preliminary heating leads to denaturation, acceleration of gastroduodenal digestion and decrease of allergenic capacity. Therefore, heated lentil is less dangerous for allergic patients than its fresh seedlings.

The work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 20-45-05002).

УДК: 615.322 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-430-432

ВИДЫ МЯТЫ, ПРОИЗРАСТАЮЩИЕ НА КАВКАЗЕ И ИМЕЮЩИЕ ПИЩЕВОЕ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Цибульская А.Р., Рыбалко А.А., Шмат Е.В.

Сочинский институт (филиал) ФГАОБУ ВО Российского университета дружбы народов 354348, Южный Федеральный округ, Краснодарский край, г. Сочи, ул. Куйбышева, 32.
e-mail: sfrudn@rambler.ru

Проведены исследования по микроразмножению важного фармацевтического и пищевого растения мяты водной (*M. aquatica*), произрастающей в Сочинском Причерноморье. Размножение проводили нодальными эксплантами. При выращивании на питательной среде Мурасиге-Скуга с 0,1-0,2 мг/л НУК и 0,5-1,0 мг/л кинетина коэффициент размножения составил 1:15 – 1:20 в месяц. При освещении люминесцентными лампами получено 0,45±0,01 мг биомассы на одну пробирку ПБ-16, а при светодиодном освещении - 0,98±0,05 мг.

Ключевые слова: мята водная, нодальные экспланты, коэффициент размножения, светодиодное освещение.

Род *Mentha*, насчитывающий более 30 видов, произрастает в мире почти во всех агроклиматических условиях (1). Некоторые из распространенных видов, такие как *M. aquatica* L., *M. arvensis*, *M. citrata*, *M. longifolia*, *M. piperita*, *M. pulegium*, *M. rotundifolia* и *M. spicata* обычно выращивают для производства эфирного масла (ЭМ) и / или используются в качестве пищевых ароматизаторов и лекарственных средств во многих странах Европы, Австралии, Америки и Ближнего Востока.

На Кавказе произрастает, по меньшей мере, 4 вида мяты: *M. aquatica* L., *M. longifolia* (L.) Huds., *M. pulegium* L. и *M. spicata* L. (2,3).

Мы провели исследования по введению мяты водной (*M. aquatica* L.) в культуру *in vitro*. Семена собирали на территории НИИ медицинской приматологии в Адлерском районе г. Сочи. Для стимуляции прорастания использовали постоянное магнитное поле, создаваемое постоянным магнитом тороидального типа D45d22h7. Мощность магнитного поля составила 0,5 мТ. Под влиянием магнитного поля установлено увеличение процента прорастания семян *Mentha aquatica* L.: магнит - 78,3, контроль - 66,8 %.

Из проростков нарезали нодальные экспланты величиной 3 – 5 мм и выращивали в культуре *in vitro*. Применяли питательную среду Мурасиге-Скуга (4) с 0,1-0,2 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК) и 0,5-1,0 мг/л кинетина и 20 г/л сахарозы. Использовали биологические пробирки ПБ-16. Питательную среду готовили на основе реагентов фирмы SIGMA-USA. В многочисленных опытах установлен коэффициент размножения 1:15 - 1:20 в месяц, что важно для получения больших партий однородного посадочного материала в короткие сроки с целью создания промышленных насаждений.

Испытание различных источников света показало, что при использовании люминесцентного освещения получено $0,45 \pm 0,01$ мг биомассы на одну пробирку ПБ-16, а при светодиодном освещении (синие 30%+красные 70%) - $0,98 \pm 0,05$ мг.

Акклиматизация: Для пересадки *ex vitro* растеньица извлекали из пробирок и делили на 1-2 узловые части и высаживали в пластиковые контейнеры.

Результаты исследований являются основой для микроразмножения других видов мяты, произрастающих на Кавказе.

Литература

1. Farooq Anwar, Ali Abbas, Tahir Mehmood, Anwarul-Hassan Gilani. *Mentha: A genus rich in vital nutraceuticals—A review. Phytotherapy Research* 2019, 33(1) Pages: 2548-2570.
2. Солодько А.С., Нагалецкий М.В., Кирий П.В. Атлас флоры Сочинского Причерноморья. Дикорастущие сосудистые растения. – Сочи, 2006. – 287 с.
3. Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств. Санкт-Петербург, «Мири семья-95» 1995 – 992 с.
4. Murashige T, Skoog F. A rewised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture // *Physiologia plantarum*, 15, N 4. – 1962. – P. 473–479.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-430-432

SPECIES OF MINT GROWING IN THE CAUCASUS AND HAVING FOOD AND PHARMACEUTICAL IMPORTANCE.

Tsibulskaya A.R., Rybalko A.A., Shmat E.V.

Sochi Institute (branch) FSAOBU VO Peoples' Friendship University of Russia
354348, Southern Federal District, Krasnodar Territory, Sochi, st. Kuibysheva, 32
e-mail: sfrudn@rambler.ru

Research has been carried out on micropropagation of an important pharmaceutical and food plant, water mint (*M. aquatica*), which grows in the Sochi Black Sea region. Reproduction was carried out with nodal explants. When grown on a Murashige-Skoog nutrient medium with 0.1-0.2 mg / l NAA and 0.5-1.0 mg / l kinetin, a multiplication factor of 1:15 - 1:20 per month was achieved. When lighting with fluorescent lamps, 0.45 ± 0.01 mg of biomass was obtained per one PB-16 tube, and with LED lighting - 0.98 ± 0.05 mg.

Key words: aquatic mint, nodal explants, reproduction rate, LED lighting.

The genus *Mentha*, with more than 30 reported species, grows in the world in almost all agro-climatic conditions (1). Some of the common types such as *M. aquatica* L., *M. arvensis*, *M. citrata*, *M. longifolia*, *M. piperita*, *M. pulegium*, *M. rotundifolia* and *M. spicata* are commonly grown to produce essential oil (EO) and / or are used as food flavorings and medicines in many countries of Europe, Australia, America and the Middle East.

At least 4 species of mint grow in the Caucasus: *M. aquatica* L., *M. longifolia* (L.) Huds., *M. pulegium* L. and *M. spicata* L. (2,3).

We have conducted research on the introduction of water mint (*M. aquatica* L.) into culture *in vitro*. the seeds were collected on the territory of the Research Institute of Medical Primatology in the Adler region of Sochi. To stimulate germination, a constant magnetic field created by a permanent magnet of the toroidal type D45d22h7 was used. The magnetic field strength was 0.5 mT. Under the influence of the magnetic field, an increase in the percentage of seed germination of *Mentha aquatica* L. was found: magnet - 78.3, control - 66.8%.

Nodal explants 3–5 mm in size were cut from seedlings and grown *in vitro*. The nutrient medium Murashige-Skoog (4) was used with 0.1-0.2 mg/l NAA and 0.5-1.0 mg/l kinetin and 20 g/l sucrose. Biological test tubes PB-16 were used. The culture medium was prepared on the basis of reagents from SIGMA-USA. In numerous experiments, the multiplication factor is 1:15 - 1:20 per month, which is important for obtaining large batches of uniform planting material in a short time in order to create industrial plantings.

Testing of various light sources showed that when using fluorescent lighting, 0.45 ± 0.01 mg of biomass was obtained per one PB-16 tube, and with LED lighting (blue 30% + red 70%) - 0.98 ± 0.05 mg .

Acclimatization: For *ex vitro* transplantation, the plants were removed from test tubes and divided into 1-2 nodal parts and planted in plastic containers.

The research results are the basis for micropropagation of other species of mint growing in the Caucasus.

References

1. Farooq Anwar, Ali Abbas, Tahir Mehmood, Anwarul-Hassan Gilani. *Mentha: A genus rich in vital nutraceuticals—A review. Phytotherapy Research* 2019, 33(1) Pages: 2548-2570.

2. Solodko A.S., Nagalevsky M.V., Kiriy P.V. Atlas of the flora of the Sochi Black Sea region. Wild vascular plants. - Sochi, 2006. – 287 p.
3. Cherepanov S.K. Vascular Plants of Russia and Neighboring States. St. Petersburg, "Miri family-95" 1995 - 992 p.
4. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture // *Physiologia plantarum*, 15, No. 4. - 1962. - P. 473–479.

УДК 573.6.086.83 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-432-433

СТАБИЛИЗАЦИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ С ПОМОЩЬЮ БИОДОБАВКИ ИЗ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Юшина Е.А., Красуля О.Н., Новикова Ж.В., Григорьевская И.И., Сергеева С.М., Цыганкова А.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств», Москва, Россия
125080, Москва, Волоколамское шоссе, дом.11
e-mail: Elena020292@mail.ru

Применение препарата из биомассы микромицета *Mortierella nigrescens* позволяет стабилизировать консистенцию готовой продукции, увеличить срок ее хранения, улучшить органолептические свойства

Ключевые слова: антиоксиданты, микромицет *Mortierella nigrescens*, полиненасыщенные жирные кислоты, стабилизатор консистенции, хитозан

Антиоксиданты (антиокислители) – вещества, замедляющие процессы окисления пищевых продуктов, защищая, таким образом, жиры и жиросодержащие продукты от прогоркания. Прогоркание жиров и жиросодержащих продуктов – результат сложных химических и биохимических процессов, протекающих в липидном комплексе. При этом антиоксиданты не только защищают жировой компонент пищевого продукта, но и ингибируют действие свободных радикалов на организм человека. Для увеличения стойкости пищевых продуктов, содержащих жиры и витамины, используют природные и синтетические антиоксиданты. В качестве антиоксиданта можно использовать препарат из биомассы микромицета *Mortierella sarnyuensis*, который получают следующим образом.

Биомассу микромицета *Mortierella nigrescens* последовательно экстрагируют неполярным экстрагентом, например, инертным газом, азотом, закисью азота, двуокисью углерода или метаном, в надкритическом состоянии, водой, щелочью, водой, кислотой, водой, щелочью и водой с последующим объединением первого экстракта с твердым остатком. Полученный антиоксидант обладает слабым грибным запахом и сероватым цветом.

Результаты опытной проверки показали, что при введении менее 0,1% антиоксиданта скорость окислительных процессов в продуктах практически не отличается от контрольных образцов. При введении антиоксиданта в количестве 0,1% и более заметно замедление окислительных процессов. Дозировка 0,5% антиоксиданта не вызывает заметного изменения органолептических свойств продуктов. При введении 0,5-1,2% антиоксиданта наблюдается резкое увеличение вязкости, а затем желирование таких продуктов, как соки и напитки. В тех же концентрациях у фруктовых продуктов появляется оттенок запаха антиоксиданта, отрицательно оцениваемый при дегустации. В мясных, рыбных и овощных продуктах наличие антиоксиданта определяется в тонах аромата в концентрациях 3-5%, но оценивается положительно.

Одновременно установлено, что введение антиоксиданта стабилизирует консистенцию текучих продуктов, в том числе соков с мякотью и замутненных напитков при концентрациях, не влияющих на аромат, пищевых эмульсий типа соусов и маргарина, препятствует синерезису жиров в сырах, фаршевых, колбасных и мучных изделиях в количествах, не оказывающих отрицательного влияния на их цвет. Комплекс этих свойств объясняется значительным содержанием в антиоксиданте ненасыщенных жирных кислот и хитозана и отсутствием сопутствующих веществ, способных катализировать окислительные процессы, интенсифицировать коагуляцию.

Применение данного способа стабилизации обладает расширенной сферой применения, обеспечивает увеличение срока хранения продуктов за счет стабилизации консистенции и улучшения органолептических свойств.

Литература

1. Дамодаран Шринивасан, Паркин Кирк, Феннема Оуэн Р. Химия пищевых продуктов. – СПб.: Профессия, 2012. - 1039 с.

2. Eroshin V.K., Dedyukina E.G. Effect of lipids from *Mortierella hygrophila* on plant resistance to phytopathogens // *World J. of Mikrobiol. & Biotechnol.* 2002.-Vol.18.-P.165-167
3. Eroshin V.K., Дедюхина Э.Г. и др. Исследование синтеза арахидоновой кислоты грибами рода *Mortierella*: микробиологический метод селекции продуцентов арахидоновой кислоты // *Микробиология.* 1996.- Т.65, вып.1.- с. 31-36

UDC 573.6.086.83 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-432-433

STABILIZATION OF FOOD PRODUCTS BY MEANS OF BIO-SUPPLEMENTS FROM MICROSCOPIC MUSHROOMS

Yushina E.A., Krasulya O.N., Novikova Zh.V., Grigoryevskaya I.I., Sergeeva S.M., Cygankova A.A.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Moscow State University of Food Production", Moscow, Russia
115080, Moscow, Volokolamsk highway, 11
e-mail: Elena020292@mail.ru

The use of the preparation from the biomass of micromycete *Mortierella nigrescens* makes it possible to stabilize the consistency of the finished product, increase its shelf life, and improve organoleptic properties

Key words: antioxidants, Micromycete of *Mortierella nigrescens*, polyunsaturated fatty acids, stabilizer consistency, chitosan.

Antioxidants - a substance that slows the oxidation of foodstuffs, protecting, thus, fats and fat-containing products from rancidity. Rancidity of fats and fat-containing products is the result of complex chemical and biochemical processes in the lipid complex. At the same time, antioxidants not only protect the fat component of the food product, but also inhibit the effect of free radicals on the human body. To increase the durability of foods containing fats and vitamins, natural and synthetic antioxidants are used.

As an antioxidant, a preparation from biomass of micromycete *Mortierella sarnyensis* can be used, which is prepared as follows.

The biomass of micromycete *Mortierella nigrescens* is sequentially extracted with a non-polar extractant, for example, an inert gas, nitrogen, nitrous oxide, carbon dioxide or methane, in the supercritical state, water, alkali, water, acid, water, alkali and water, followed by combining the first extract with a solid residue. The resulting antioxidant has a faint fungus odor and a grayish color.

The results of the pilot test showed that with the introduction of less than 0.1% antioxidant, the rate of oxidative processes in the products practically does not differ from the control samples. With the introduction of an antioxidant in an amount of 0.1% or more, a slowdown in oxidative processes is noticeable. A dosage of 0.5% antioxidant does not cause a noticeable change in the organoleptic properties of the products.

With the introduction of 0.5-1.2% antioxidant, a sharp increase in viscosity is observed, and then gelation of products such as juices and drinks. At the same concentrations, fruit products have a tint of antioxidant odor, which is negatively evaluated during tasting.

In meat, fish and vegetable products, the presence of an antioxidant is determined in tones of aroma at concentrations of 3-5%, but is evaluated positively.

At the same time, it was found that the introduction of an antioxidant stabilizes the consistency of fluid products, including juices with pulp and clouded drinks at concentrations that do not affect aroma, food emulsions such as sauces and margarine, and prevents the syneresis of fats in cheeses, minced meat, sausage and flour products in quantities not adversely affecting their color. The complex of these properties is explained by the significant content of unsaturated fatty acids and chitosan in the antioxidant and the absence of concomitant substances that can catalyze oxidative processes and intensify coagulation.

The use of this stabilization method has an extended scope, provides an increase in the shelf life of products by stabilizing the consistency and improving organoleptic properties.

References

1. Damodaran Srinivasan, Parkin Kirk, Fennema Owen R. *Food Chemistry*. -C lib.: Occupation, 2012.- 1039 p.
2. Eroshin V. The K., Dedyukina E., The G. Effect of Lipids from of *Mortierella hygrophila* on plant resistance to phytopathogens // *World J. of Mikrobiol. & Biotechnol.* 2002.-Vol.18.-P.165-167
3. Eroshin In . K., Dedyukhina e . R . and others . A study of the synthesis of arachidonic acid by fungi of the genus *Mortierella* : a microbiological method for the selection of producers of arachidonic acid // *Microbiology.* 1996.- T. 65, issue 1.- p. 31-36

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ: ОТ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ НАУКИ ДО ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

GENE ENGINEERING IN LIVESTOCK: FROM FUNDAMENTAL STUDIES TO PRACTICAL APPLICATION

Руководитель

Н.А. Зиновьева академик РАН, директор ВИЖ им. Л.К. Эрнста /
 N.A. Zinoviyeva academician of RAS, director of Ernst FGBNU VIZh

| | |
|--|-----|
| 1. ОЦЕНКА БИОРАЗНООБРАЗИЯ РОССИЙСКИХ АБОРИГЕННЫХ ПОРОД КОЗ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ПОЛНОГЕНОМНОГО SNP АНАЛИЗА Денискова Т.Е., Доцев А.В., Волкова В.В., Селионова М.И., Форнара М.С., Рейер Х., Виммерс К., Брем Г., Зиновьева Н. А. | 434 |
| EVALUATION OF BIODIVERSITY IN RUSSIAN LOCAL GOAT BREEDS BASED ON WHOLE-GENOME SNP ANALYSIS Deniskova T.E., Dotsev A.V., Volkova V.V., Selionava M. I., Fornara M.S., Reyer H., Wimmers K., Brem G., Zinoviyeva N.A. | 435 |
| 2. ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МОЗГА КОЗ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ ПРИОНАМИ КЛАССИЧЕСКОЙ ГУБКОБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КОРОВ Надточей Г.А., Вангели С.В., Стаффорд В.В. | 436 |
| PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES IN THE BRAIN OF GOATS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH CLASSICAL BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY (C-BSE) PRIONS Nadtochey G.A., Vangeli S.V., Stafford V. V. | 437 |
| 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА В МОЛОКЕ ТРАНСГЕННЫХ КОЗ И ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОЛОКА БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЯХ Д.А.Семёнов, О.В.Свиридов | 438 |
| DETERMINATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE RECOMBINANT HUMAN LACTOFERRIN IN MILK OF TRANSGENIC GOATS AND PROTEIN FRACTIONS ISOLATED FROM MILK D.Semenov, O.Sviridov | 439 |

УДК 636.39 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-434-436

ОЦЕНКА БИОРАЗНООБРАЗИЯ РОССИЙСКИХ АБОРИГЕННЫХ ПОРОД КОЗ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ПОЛНОГЕНОМНОГО SNP АНАЛИЗА

**Денискова Т. Е.¹, Доцев А. В.¹, Волкова В.В.¹, Селионова М.И.², Форнара М. С.¹, Рейер Х.³, Виммерс К.³,
 Брем Г.^{1,4}, Зиновьева Н. А.¹**

¹ Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, п. Дубровицы, Россия
 142132, Московская область, Городской округ Подольск, п. Дубровицы, д. 60
 e-mail: horarka@yandex.ru

² Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева, Москва, Россия
 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 49

³ Институт геномной биологии Лейбницкого института биологии сельскохозяйственных животных, Думмер-
 сторф, Германия
 18196 Думмерсторф, Wilhelm-Stahl-Allee, д. 2

⁴ Институт животноводства и генетики, Ветеринарно-медицинский университет, Вена, Австрия
 A-1210 Вена, Veterinaerplatz, д. 1.

Впервые выполнена оценка генетического разнообразия аборигенных пород коз России на основе данных полногеномного SNP-анализа. Выявлены тенденции снижения эффективных размеров популяций коз, но при этом рассчитанные показатели уровня биоразнообразия не уступают значениям, полученным для мировых пород коз. Полученные результаты свидетельствуют о том, что возможности сохранения ценного генофонда локальных пород еще не утрачены.

Ключевые слова: козы; SNP-маркеры; ДНК-чипы; генетическое разнообразие; аборигенные породы

Внедрение геномных технологий все еще отстает в российской козоводческой отрасли. Из-за наблюдаемого пренебрежения некоторыми аборигенными породами (например, оренбургской) и отсутствия данных об истории создания других пород (например, дагестанская грубошерстная, карачаевская), разработка эффективных стратегий разведения, основанных на достоверной информации о текущем состоянии генофонда, является ключевым фактором для предотвращения потери биоразнообразия коз. В связи с этим, целью нашей работы стала оценка генетического разнообразия российских аборигенных пород коз для создания программ по сохранению этих ценных ресурсов как части национального социокультурного наследия. Для нашего исследования были отобраны образцы ткани от российских аборигенных пород, в том числе горноалтайской ($n = 33$), оренбургской ($n = 32$), советской шерстной ($n = 30$), дагестанской молочной ($n = 14$), дагестанской грубошерстной ($n = 20$), дагестанской пуховой ($n = 14$) и карачаевской ($n = 37$). Генотипирование проводили с использованием Goat 50K SNP BeadChip (Illumina, США). SNP-данные были биоинформационно обработаны в PLINK v1.9., R-пакете «diveRsity» и программном обеспечении *ShEP*. Средние уровни наблюдаемой (H_o) и ожидаемой (H_e) гетерозиготности составили 0,407 и 0,403 по всем породам, варьируя от минимального значения в карачаевской ($H_o = 0,389$; $H_e = 0,382$) до максимального в дагестанской молочной породе ($H_o = 0,434$; $H_e = 0,417$). Аллельное разнообразие было выше 1,982 у шести пород с вычисленными максимальными значениями в дагестанской молочной и дагестанской грубошерстных породах (1,997) и было самым низким в карачаевской породе (1,975). Дагестанская пуховая и оренбургская породы характеризовались самыми высокими значениями эффективного размера популяции, оцененного для трех и пяти поколений назад ($N_{e3} = 342$ и 414; $N_{e5} = 445$ и 511 соответственно), тогда как для карачаевской и дагестанской молочной пород были зафиксированы самые низкие значения аналогичными показателей ($N_{e3} = 136$ и 136; $N_{e5} = 146$ и 183 соответственно). Значения исторических эффективных размеров популяций, рассчитанные для 50 поколений назад, варьировались от 469 в карачаевской до 2528 в дагестанских грубошерстных породах. Таким образом, мы провели первую комплексную оценку генетического разнообразия местных генетических ресурсов коз в России. Несмотря на очевидное снижение эффективных размеров популяции некоторых аборигенных пород коз, рассчитанные уровни показателей генетического и аллельного разнообразия не являются критическими и сопоставимы со значениями тех же показателей, рассчитанных для мировых пород коз в рамках проекта AdaptMap. Таким образом, полученные результаты будут использованы при разработке селекционных программ для российских пород коз, чтобы обеспечить их эффективное сохранение и рациональное использование.

Генотипирование 96 коз было проведено при финансовой поддержке РФФ № 19-76-20006. Настоящая работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ в соответствии с исследовательским проектом № 18-316-20006.

UDC 636.39 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-434-436

EVALUATION OF BIODIVERSITY IN RUSSIAN LOCAL GOAT BREEDS BASED ON WHOLE-GENOME SNP ANALYSIS

Deniskova T. E.¹, Dotsev A. V.¹, Volkova V. V.¹, Selionava M. I.², Fornara M. S.¹, Reyer H.³, Wimmers K.³, Brem G.^{1,4}, Zinovieva N. A.¹

¹ Federal Science Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Dubrovitsy. Russia 142132, Moscow region, Podolsk Municipal District, Dubrovitsy, 60
e-mail: horarka@yandex.ru

² Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia 127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49

³ Institute of Genome Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Dummerstorf, Germany 18196, Dummerstorf, Wilhelm-Stahl-Allee 2

⁴ Institute of Animal Breeding and Genetics, University of Veterinary Medicine, Vienna Austria 1210, Vienna, Veterinaerplatz 1

The genetic diversity of Russian local goats was estimated for the first time based on whole-genome SNP data. The tendencies of decrease in the effective population sizes were revealed, but the calculated biodiversity indicators are not inferior to the values obtained for the world goat breeds. The results indicate that there are still possibilities to preserve the valuable gene pool of local breeds.

Key words: goats; SNP markers DNA chips; genetic diversity; local breeds

The implementation of genomic technologies is still lagging in Russian goat industry. Due to observed neglecting of some local breeds (e.g. Orenburg) and no data on developmental history of other breeds (e.g. Dagestan Wool, Karachaev), creating of effective breeding strategies based on reliable information on current status of gene pool is key to prevent the dramatic loss of their biodiversity. The purpose of our work is evaluation of genetic diversity of Russian local goat breeds to preserve these valuable resources as a part of national sociocultural heritage. For this study, we collected samples from Russian local breeds including Altai Mountain (n=33), Orenburg (n=32), Soviet Mohair (n=30), Dagestan Milk (n=14), Dagestan Wool (n=20), Dagestan Fluff (n=14) and Karachaev (n=37). The genotyping was performed using Goat 50K SNP BeadChip (Illumina, USA). SNP-data was processed in PLINKv1.9., R package 'diveRsity' and *SneP* software. Overall mean values of observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity were 0.407 and 0.403 varying from minimums in Karachaev ($H_o=0.389$; $H_e=0.382$) to maximums in Dagestan Milk breed ($H_o=0.434$; $H_e=0.417$). Allelic richness was higher than 1.982 in six breeds with maximal values in Dagestan Milk and Dagestan Wool (1.997) and was the lowest in Karachaev breed (1.975). The Dagestan Fluff and Orenburg breeds had the highest values of the effective population sizes estimated for three and five generations ago ($N_{e3}=342$ and 414; $N_{e5}=445$ and 511, respectively), whereas Karachaev and Dagestan Milk displayed the lowest values ($N_{e3}=136$ and 136; $N_{e5}=146$ and 183, respectively). The values of historical effective population sizes estimated for 50 generations varied from 469 in Karachaev to 2528 in Dagestan Wool. Here, we presented the first comprehensive evaluation of genetic diversity of Russian local goat resources. Despite the obvious decrease in effective population sizes of goat breeds, estimated levels of genetic and allelic diversity indicators are not critical and are comparable with those obtained in wide range of goat populations within the AdaptMap project. Thus, our results will be used to develop breeding programs for Russian goat breeds to ensure their effective preservation and sustainable utilization.

The genotyping of 96 goats was funded by RSF No. 19-76-20006. The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-316-20006.

The genomic study of Romanov sheep was carried out within the research theme 0445-2019-0026 (AAAA-A18-118021590138-1) by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation. The genomic profiles of coarse fat-tailed and fat-rumped sheep used as comparison groups were obtained with the financial support of the RSF project No. 19-16-00070.

УДК 619: 616.9: 616-091.8 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-436-438

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МОЗГА КОЗ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ ПРИОНАМИ КЛАССИЧЕСКОЙ ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КОРОВ

Надточей Г.А., Вангели С.В., Стаффорд В.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»
 109428, Москва, Рязанский проспект, д.24, корп. 1.
 e-mail: g_a_nadtochei@mail.ru

При инфицировании коз прионами К-ГЭК световой и электронной микроскопией выявлены глубокие деструктивные изменения во всех отделах головного мозга.

Ключевые слова: прионы, губкообразная энцефалопатия коз, патоморфология.

Хотя прионные болезни установлены у многих видов животных, зоонозный потенциал достоверно установлен только у возбудителя классической губкообразной энцефалопатии коров (К-ГЭК), который вызывает у человека вариант болезни Крейтцфельдта-Якоба (1). Эпизоотия К-ГЭК окончилась в 2016 г, однако озабоченность специалистов вызывает возможность поддержания резервуара инфекции в популяции мелких жвачных, овец и коз, т.к. они в 80-90-х годах во многих странах получали в корм мясокостную муку, загрязненную прионом К-ГЭК. Экспериментально показано, что отличить К-ГЭК у овец и коз от скрепи-инфекции, которая распространена во всех странах мира, можно только сложными лабораторными исследованиями, в то время как в инкубационном периоде инфицированные животные накапливают прион не только в тканях ЦНС, но и в лимфодной ткани задолго до проявления клинических признаков болезни, поэтому инфицированные животные могут попасть в пищевую цепь людей как здоровые животные. Хотя до настоящего времени естественных случаев К-ГЭК у овец не установлено, случаи её у коз описаны во

Франции (2) и Великобритании. Экспериментально показано, что возбудитель К-ГЭК, прошедший пассажи на овцах и козах становится более патогенным и с высокой степенью эффективности поражает трансгенных мышей, экспрессирующих прионный белок человека, следовательно люди могут быть более чувствительны к такому приону.

Целью работы было изучить патоморфологические изменения тканей головного мозга коз при экспериментальной инфекции К-ГЭК. В опыте использовали 12 коз белой русской породы. Заболели все опытные животные. Патогистологические изменения в ЦНС проявлялись в вакуолизации нейропиля особенно интенсивной в продолговатом мозге и основании мозга, таламусе, в ядрах спинального тракта тройничного нерва, мозжечке. Менее интенсивный спонгиоз был в боковых отделах коры мозга. Во многих нейронах нейроплазма видна в виде отдельных сгустков. Отдельные нейроны были пикноморфны, их тела и апикальные дендриты были сильно окрашены и их структура не просматривалась. В ядрах многих нейронов выявляли конденсацию хроматина или его частичное исчезновение. Иммунохимическая реакция была положительной во всех отделах головного мозга. Отложения прионного белка выявлялись в виде грубых частиц или тонкого пылевидного осадка. В таламусе выявлены отложения грубого осадка в виде лучистой бляшки.

Субмикроскопический анализ тканей головного мозга подопытных животных выявил сложные патологические изменения в структурах органелл клеток. Цитоплазма нейронов имела электронносветлые области очагового набухания, в которых выявлялся тонкий гранулярный компонент и мелкие везикулы. Многие митохондрии были с выраженной деструкцией крист и оболочки, дегенерирующие митохондрии выявляли также в пресинаптических окончаниях дендритов и аксонах. В пресинаптических окончаниях очень часто выявляются тубуловезикулярные структуры, ранее описанные Либерским. В нейроплазме постоянно встречаются формирующиеся аутофагосомы и ветвящиеся цистерны.

Литература

1. Collinge J, Rossor M. A new variant of prion disease. *Lancet* 1996;347: 916–17. doi: 10.1016/s0140-6736(96)91407-5.
2. Eloit M., Adjou K., Couplier M. et al. BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec.* 2005 Apr 16;156(16):523-4. doi: 10.1136/vr.156.16.523-b.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-436-438

PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES IN THE BRAIN OF GOATS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH CLASSICAL BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY (C-BSE) PRIONS

Nadtochey G.A., Vangeli S.V., Stafford V.V.

Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" (FSC VIEV)
Ryazanskiy prospekt, 24, 1, Moscow 109428, Russia

Light and electron microscopy revealed deep destructive changes in all parts of the brain of C-BSE infected goats.

Key words: prion, caprine spongiform encephalopathy, pathomorphology

Although prion diseases have been found in many animal species their zoonotic potential is really associated only with C-BSE which causes a variant of Creutzfeldt-Jacob disease in humans (1). The C-BSE epizootic ended in 2016 but the experts are concerned about the possibility of maintenance of reservoirs of the infection in populations of small ruminants (sheep and goats) since the animals received feed contained C-BSE contaminated meat-and-bone meal in many countries in 80-90s. It was experimentally shown that to distinguish caprine and ovine C-BSE from scrapie infection (which is present in all countries of the world) is possible only using complex laboratory tests. It was shown that during the incubation period infected animals accumulate prions not only in CNS tissues but also in lymphoid tissues long before the appearance of clinical signs, that is why the infected animals can enter the food chain for people as normal ones. Although no natural C-BSE cases in sheep have been found, C-BSE cases in goats have been described in France (2) and Great Britain.

It has been experimentally shown that the pathogenic C-BSE agent passed in sheep and goats becomes more pathogenic and with it affects transgenic mice expressing human prion protein; that why people can be more sensitive to the prion.

The aim of the work was to study pathomorphological changes in brain tissues of goats experimentally infected with C-BSE. Twelve goats of white Russian breed were used in the experiment. All experimental animals became

infected. Pathological changes in the CNS were seen as vacuolation of the neuropil; it was especially intense in the medulla oblongata and the base of the brain, the thalamus, in the nuclei of the spinal tract of the trigeminal nerve, the cerebellum; less intense spongiosis was seen in the lateral cortex. In numerous neurons the neuroplasma was seen as separate clots. Separate neurons were picnomorphous; their bodies and apical dendrites were hardly stained and their structure was not visible. Chromatin condensation or partial its disappearance was observed in the nuclei of many neurons. Immunochemical reaction was positive in all parts of the brain. Prion protein deposits were seen as coarse particles of a fine dust-like sediment. In the thalamus coarse sediment deposits were found in the form of a radiant plaque.

Submicroscopic analysis of brain tissues from experimental animals revealed complex pathological changes in structures of organelles. The cytoplasm of neurons had electron-bright areas of focal swelling in which a thin granular component and small vesicles were detected. Numerous mitochondria in the presynaptic endings of dendrites and axons were also detected. Tubulovesicular structures, previously described by P. Liberski, were often detected in presynaptic endings. Autophagosomes and branching cisterns were constantly seen in the neuroplasm.

References

1. Collinge J., Rossor M. A new variant of prion disease. *Lancet*, 1996, 347: 916-917.
2. Eloit M., Adjou K., Couplier M. et al. BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec*, 2005 Apr 16, 156, 16:523-524. Doi: 10.1136/vr.156.16.523-b.

УДК [577.112.853 + 577.112.854]:57.083.3:604 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-438-440

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА В МОЛОКЕ ТРАНСГЕННЫХ КОЗ И ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОЛОКА БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЯХ

Д.А.Семёнов, О.В.Свиридов

Институт биоорганической химии НАН Беларуси
 Беларусь, 220141, Минск, ул. Академика В.Ф.Купревича, д. 5, корп. 2,
 e-mail: dsemenov@iboch.by, +375333459503

Получены и охарактеризованы специфические иммунореагенты для технологий иммуноанализа рекомбинантного лактоферрина человека в пищевой и биотехнологической продукции.

Ключевые слова: рекомбинантный лактоферрин человека, трансгенные козы, иммуноанализ, магнитные частицы, наночастицы золота, европий.

Лактоферрин (ЛФ) представляет собой негемовый железосвязывающий гликопротеин млекопитающих, относящийся к семейству трансферринов. ЛФ является полифункциональным белком, помимо транспорта железа он модулирует иммунные реакции, обладает антиоксидантной активностью, противораковыми и противовоспалительными свойствами [1]. Разнообразие функциональных свойств ЛФ объясняет повышенный спрос на него, как субстанцию для производства лекарственных форм, продуктов функционального питания и биологически активных добавок к пище разнонаправленного действия. В мировой биотехнологии человеческий ЛФ производится в виде рекомбинантного белка (рчЛФ), продуцируемого в нескольких системах экспрессии, включая трансгенных животных.

В настоящее время стоит задача доказательства сохранения биологической активности рчЛФ, структура которого не повреждена естественным старением или физико-химическими воздействиями при получении, транспортировании или хранении продуктов, его содержащих. Надежным показателем структурного состояния, отвечающего биологически активной форме белков, в частности, лигандсвязывающих гликопротеинов, к которым относится ЛФ, является их иммунореактивность как количественная характеристика взаимодействия с антителами, выработанными к биоактивным белкам с неповрежденными пространственной и линейной структурами. Количественное определение иммунореактивных белков в составе различных сред выполняется иммунохимическими методами.

Целью данной работы являлось получение иммунореагентов на основе рчЛФ, их характеристика и практическое применение.

В работе получены очищенные специфические поликлональные антитела к рчЛФ, синтезированы конъюгаты антител с ферментом, комплексонатом европия и наночастицами золота, конъюгат рчЛФ с магнитными частицами, а также комплекс рчЛФ, специфически меченный по металлосвязывающему центру

ионами европия. Для получения специфических антител антисыворотку очищали с помощью антиген-аффинной хроматографии. Конъюгаты антител с комплексоном европия и рЧЛФ с магнитными частицами были синтезированы путем ацилирования аминогрупп белка активированным эфиром комплексона европия или карбоксильными группами, имеющимися на поверхности магнитных частиц в присутствии водорастворимого карбодиимида. Наночастицы золота получали по методу Френса и конъюгировали с антителами. Конъюгат антител с пероксидазой из корней хрена получали через окисленный углеводный компонент фермента с образованием основания Шиффа. Метод получения комплекса рЧЛФ с ионами европия состоял в смешивании растворов рЧЛФ и хлорида европия (III) в присутствии нитрилтриуксусной кислоты с последующей очисткой гель-хроматографией. Исследованы четыре конструкции тест-систем с применением выше перечисленных иммунореагентов, определены аналитические характеристики.

Таким образом, полученные и охарактеризованные специфические иммунореагенты и исследованные конструкции могут служить основой разработки тест-системы для количественного определения биологически активного рекомбинантного лактоферрина человека в молоке трансгенных коз и выделенных из молока белковых фракциях.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований «Химические технологии и материалы» на 2016 – 2020 годы.

Литература

1. Kanwar J.R., Roy K., Patel Y., Zhou S.F., Singh D., Nasir M., Sehgal A., Singh R.S., Garg S. and Kanwar R.K. Multifunctional iron bound lactoferrin and nanomedicinal approaches to enhance its bioactive functions // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20, № 6. – P. 9703-9731.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-438-440

DETERMINATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE RECOMBINANT HUMAN LACTOFERRIN IN MILK OF TRANSGENIC GOATS AND PROTEIN FRACTIONS ISOLATED FROM MILK

D.Semenov, O.Sviridov

*Institute of Bioorganic Chemistry of NAS of Belarus
Belarus, 220141, Minsk, Academician V.F. Koupreovich St., 5/2*

Specific immunoreagents for the immunoassay technologies of recombinant human lactoferrin in food and biotechnological products have been obtained and characterized.

Key words: recombinant human lactoferrin, transgenic goats, immunoassay, magnetic particles, gold nanoparticles, europium.

Lactoferrin (LF) is a non-heme iron-binding mammalian glycoprotein belonging to the transferrin family. LF is a multifunctional protein, in addition to iron transport, it modulates immune responses, has antioxidant activity, anti-cancer and anti-inflammatory properties [1]. The variety of functional properties of LF explains the increased demand for it as a substance for the production of dosage forms, functional food products and biologically active food additives of multidirectional effects. In global biotechnology, human LF is manufactured as a recombinant protein (rhLF) obtained in several expression systems including transgenic animals.

Currently, the task is to prove the conservation of biological activity of rhLF, the structure of which is not damaged by natural aging or physico-chemical effects during the obtaining, transportation or storage of products containing it. A reliable indicator of the structural state corresponding to the biologically active form of proteins, in particular, ligand-binding glycoproteins, to which LF belongs, is their immunoreactivity as a quantitative characteristic of the interaction with antibodies generated to bioactive proteins with intact spatial and linear structures. Quantitative determination of immunoreactive proteins in various media is carried out by immunochemical methods.

The purpose of this work was to obtain immunoreagents based on rhLF, their characteristics and practical application.

We have obtained purified specific polyclonal antibodies to rhLF, synthesized conjugates of antibodies with an enzyme, europium complexonate and gold nanoparticles, rhLF conjugate with magnetic particles, and an rhLF complex specifically labeled at the metal-binding center with europium ions. To obtain specific antibodies, the antiserum was purified using antigen-affinity chromatography. The conjugates of antibodies with europium complexonate and rhLF with magnetic particles were synthesized by acylation of protein amino groups with

activated ester of europium complexonate or carboxyl groups present on the surface of magnetic particles in the presence of water-soluble carbodiimide. Gold nanoparticles were obtained according to the Frens method and further conjugated with antibodies. The conjugate of antibodies with horseradish peroxidase was obtained through the oxidized carbohydrate component of the enzyme with the formation of Schiff base. The method of obtaining the rhLF complex with europium ions consisted in mixing solutions of rhLF and europium (III) chloride in the presence of nitrilotriacetic acid, followed by purification by gel chromatography. Four constructions of test-systems were investigated using the above listed immunoreagents, and analytical characteristics were determined.

Thus, the obtained and characterized specific immunoreagents and studied immunoassay constructions can serve as the basis for the development of a test-system for the quantitative determination of biologically active recombinant human lactoferrin in milk of transgenic goats and protein fractions isolated from milk.

Grant: This work was financially supported by the State program of scientific research «Chemical technologies and materials» for 2016 – 2020 years.

References

1. Kanwar J.R., Roy K., Patel Y., Zhou S.F., Singh D., Nasir M., Sehgal A., Singh R.S., Garg S. and Kanwar R.K. Multifunctional iron bound lactoferrin and nanomedicinal approaches to enhance its bioactive functions // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20, № 6. – P. 9703-9731.

О ПОДГОТОВКЕ ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ КАДРОВ, В ТОМ ЧИСЛЕ, ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

TRAINING OF HIGHLY QUALIFIED SPECIALISTS IN BIOTECHNOLOGY AND GENE ENGINEERING

Руководители

В.И. Панфилов профессор, д.т.н., зав. кафедрой биотехнологии, РХТУ имени Д.И. Менделеева /

V.I. Panfilov professor, head of sub-Department of Biotechnology of Mendeleev Russian University of Chemical Technology

Т.В. Овчинникова 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 /

T.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

| | |
|---|-----|
| 1.0 ПОДГОТОВКЕ СТУДЕНТОВ ПО УГСН 19.00.00 «ПРОМЫШЛЕННАЯ ЭКОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИИ» ПО СИСТЕМЕ 2 + 2 +2 Биглов Р.Р., Соломонов В.А. | 441 |
| ON THE TRAINING OF STUDENTS ON THE USS 19.00.00 "INDUSTRIAL ECOLOGY AND BIOTECHNOLOGY" ON THE SYSTEM OF 2 Q 2 Byglov R. R., Solomonov V. A. | 443 |
| 2. ПОДГОТОВКА МАГИСТРОВ-БИОТЕХНОЛОГОВ В РХТУ ИМ. Д.И.МЕНДЕЛЕЕВА ГЛАЗАМИ СТУДЕНТОВ: ОЖИДАНИЕ И РЕАЛЬНОСТЬ Красноштанова А.А. | 444 |
| TRAINING OF MASTER BIOTECHNOLOGISTS IN D. MENDELEEV UNIVERSITY OF CHEMICAL TECHNOLOGY OF RUSSIA THROUGH THE EYES OF STUDENTS: EXPECTATION AND REALITY Krasnoshtanova A.A. | 445 |
| 3. ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕРНОЙ ОСНОВНОЙ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПО ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ В СВЯЗИ С АКТУАЛИЗАЦИЕЙ ФГОС ВО 3++ Мезенова О.Я., Агафонова С.В. | 446 |
| FEATURES OF THE APPROXIMATE BASIC EDUCATIONAL PROGRAM OF HIGHER EDUCATION IN FOOD BIOTECHNOLOGY IN CONNECTION WITH THE UPDATING OF THE FGOS 3++ Mezenova O.J., Agafonova S.V. | 447 |
| 4. ПЯТИЛЕТНИЙ ОПЫТ РЕАЛИЗАЦИИ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ ПОДГОТОВКИ КАДРОВ ВЫСШЕЙ КВАЛИФИКАЦИИ В ФИЦ БИОТЕХНОЛОГИИ РАН Титова Е.С., Камionsкая А.М., Шишкин С.С. | 448 |
| FIVE-YEAR EXPERIENCE IMPLEMENTATION OF POSTGRADUATE EDUCATION PROGRAM IN THE RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS Titova E.S., Kamionskaya A.M., Shishkin S.S. | 449 |
| 5. АКТУАЛИЗАЦИЯ ОПОП ПО НАПРАВЛЕНИЮ ПОДГОТОВКИ 19.03.01 БИОТЕХНОЛОГИЯ С НАПРАВЛЕННОСТЬЮ «БИОТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ» С УЧЕТОМ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ О.В. Топкова | 450 |
| ACTUALIZATION OF THE BASIC PROFESSIONAL EDUCATIONAL PROGRAMS ON THE DIRECTION OF PREPARATION 19.03.01 BIOTECHNOLOGY WITH AN ORIENTATION «BIOTECHNOLOGY OF MEDICINES» TAKING INTO ACCOUNT PROFESSIONAL STANDARDS O.V. Topkova | 452 |

УДК 60:372.8 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-441-444

О ПОДГОТОВКЕ СТУДЕНТОВ ПО УГСН 19.00.00 «ПРОМЫШЛЕННАЯ ЭКОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИИ» ПО СИСТЕМЕ 2 + 2 +2

Биглов Р.Р., Соломонов В.А.

Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "МИРЭА - Российский технологический университет" 119454 г. Москва, проспект Вернадского, дом 78, e-mail: biglov@mitht.ru

Предлагаются варианты построения образовательных программ по направлению подготовки «Биотехнология»

Ключевые слова: Федеральные образовательные стандарты высшего образования, примерные основные образовательные программы, индивидуальные траектории обучения.

В Послании Президента Российской Федерации Федеральному Собранию (под-пункт «б» пункта 1 перечня поручений по реализации Послания от 15 января 2020 года) записано: «Предусмотреть для студентов, осваивающих образовательные программы высшего образования, возможность выбора направления подготовки начиная с третьего года обучения».

Опыт реализации основных образовательных программ с выделением образовательных уровней, в том числе и первых двух курсов, имеется у ряда вузов Российской Федерации. В 1991 году решением Комитета по высшей школе Министерства науки, высшей школы и технической политики Российской Федерации трем вузам было разрешено в качестве эксперимента подготовку специалистов по многоуровневой (многоступенчатой) системе (приказ ГКНВШ № 719 от 17.08.91 г.). Одним из этих вузов был Московский институт тонкой химической технологии имени М.В. Ломоносова (МИТХТ), который за 6 лет с 1991 г. по 1997 г. перевел всех студентов дневного отделения на систему многоуровневых программ и работал по ней по 2015 г. (до объединения МИТХТ с МИР-ЭА).

Суть этой системы заключалась в том, что прием в МИТХТ осуществлялся на первый курс без указания конкретной образовательной программы (программы бакалавриата, специальности). Это было возможно потому, что все специальности или направления подготовки были так или иначе связаны с химией: «Химия», «Химическая технология и биотехнология» (позже разделившиеся на «Химическую технологию» и «Биотехнологию»), «Материаловедение» (в области неорганических веществ и полимеров), «Стандартизация и сертификация» (продуктов химической отрасли) и даже «Экономика и организация производства» (химической промышленности). Первые 2 курса студенты получали фундаментальное естественнонаучное образование по единому учебному плану (математика, физика, ряд химических дисциплин: неорганическая химия, органическая химия, аналитическая химия, и начало инженерных дисциплин: инженерная графика, техническая механика, а также дисциплина «Введение в специальность», где каждая выпускающая кафедра рассказывала о своей специальности и дальнейшем трудоустройстве).

При переводе на 3 курс студент выбирал конкретное направление бакалавриата (специальность), причем этот выбор осуществлялся по конкурсу: в основе которого лежали показатели учебного рейтинга.

На третьем и четвертом курсах завершалось фундаментальное и инженерное образования (для программ бакалавриата) – уже с ориентацией на направления и профили подготовки (моделирование, физическая химия, коллоидная химия, квантовая химия, общая химическая технология (общая биотехнология), электротехника, процессы и аппараты химических (биотехнологических) производств, основы автоматизации производств) и ряд специальных дисциплин.

Поступление на магистерские программы осуществлялось по конкурсу (по итогам сдачи вступительных экзаменов). В конкурсе участвовали и выпускники бакалавриата других вузов [1, 2, 3, 4].

Что изменилось с тех пор? Были введены новые стандарты – ФГОСы. Учебный процесс должен строиться исходя из Примерных основных образовательных программ (ПООП). На сегодня ФГОС 3++ по направлению «Биотехнология» (как для бакалавриата, так и для магистратуры) не утвержден, и мы можем работать лишь с его проектом. ПООП тем более не принята. Какие нужно внести изменения в проект ФГОС? Как нужно переделать проект ПООП?

Проект ФГОС, по-видимому, можно не менять. А в проекте ПООП предусмотреть формирование компетенций на каждом образовательном уровне.

Координационный совет в области образования "Инженерное дело, технологии и технические науки" предложил схему реализации программ бакалавриата.

Учитывая опыт МИТХТ им. М.В. Ломоносова и других высших учебных заведений можно несколько расширить предложения Координационного совета и дать право вузам:

1. Принимать абитуриентов на первый курс единым потоком по направлениям с близким образовательным фундаментом (тем, у которых учебные планы для первого или первого и второго курсов в значительной степени совпадают).
2. Разрешать студентам менять группу УГСН после окончания первого курса при наличии свободных мест на образовательных программах.
3. Предлагать студентам младших курсов изучение элективных и факультативных дисциплин, углубляющих материал фундаментальных дисциплин.
4. Распределять студентов после окончания второго курса по направлениям подготовки в соответствии с учебным рейтингом.
5. Формировать прикладные и академические профили бакалавриата и в течение третьего курса распределять по ним студентов. Студенты академических профилей ориентируются на продолжение об-

учения в магистратуре. Студенты прикладных профилей могут иметь увеличенную продолжительность практик, включая практики в организациях и компаниях потребителей выпускников.

6. Предлагать студентам старших курсов бакалавриата дополнительное изучение учебных дисциплин других направлений и профилей с использованием электронных и дистанционных технологий.

Литература

1. Соломонов В.А. О многоуровневой структуре основных образовательных программ. Высшее образование в России. 2010. № 6. С. 41-48.
2. Пшеничникова А.Б., Брагина Н.А., Биглов Р.Р., Байрамашвили Д.И., Швеце В.И. Система подготовки высококвалифицированных специалистов для биофармацевтической отрасли в МИТХТ им. М.В.Ломоносова. Биофармацевтический журнал. 2010. Т.2 №9
3. Фролова А.К., Соломонов В.А. Развитие многоуровневой системы высшего образования. Вестник МИТХТ. Серия: социально-гуманитарные науки и экология. 2014. Т. 1. № 1. С. 15-21.
4. Пшеничникова А.Б., Брагина Н.А., Соломонов В.А., Биглов Р.Р., Швеце В.И. Направления подготовки высококвалифицированных кадров для инновационной био-фармацевтической промышленности в МИТХТ им. М.В. Ломоносова. В сборнике: Биотехнология: состояние и перспективы развития материалы VIII Московского Международного Конгресса. ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. 2015. С. 427-428.

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-441-444

ON THE TRAINING OF STUDENTS ON THE USS 19.00.00 "INDUSTRIAL ECOLOGY AND BIO-TECHNOLOGY" ON THE SYSTEM OF 2 Q 2

Byglov R. R., Solomonov V. A.

M.V. Lomonosov Institute of Thin Chemical Technologies of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "MIREA - Russian University of Technology"
119454 Moscow, Vernadsky Avenue, 78, e-mail: biglov@mitht.ru

The option of building a basic educational program in the direction of biotechnology training is proposed

Key words: Federal Higher Education Standards, Exemplary Basic Education Programs

The President of the Russian Federation's Address to the Federal Assembly (subparagraph "b" of paragraph 1 of the list of instructions for the implementation of the Message of January 15, 2020) is written: "To provide for students who are mastering educational programs of higher education, the possibility of choosing the direction of training from the third year of study."

A number of universities in the Russian Federation have a number of universities in the Russian Federation about the torture of implementing basic educational programs with the allocation of educational levels, including the first two courses. In 1991, by the decision of the Committee on the Higher School of the Ministry of Science, Higher School and Technical Policy of the Russian Federation, three universities were allowed as an experiment to train specialists in a multi-level (multi-stage) system (the order of GKNVS No. 719 of 17.08.91). One of these universities was the Moscow Institute of Fine Chemical Technology named after M.V. Lomonosov (MITHT), which for 6 years from 1991 to 1997 transferred all full-time students to the system of multi-level programs and worked on it until 2015 (before the merger of MITHT with MIREA).

The essence of this system was that admission to MITHT was performed for the first year without specifying a specific educational program (bachelor's program, specialty). This was possible because all the specialties or areas of training were in one way or another related to chemistry: Chemistry, Chemical Technology and Biotechnology (later divided into Chemical Technology and Biotechnology), Material Science (in the field of inorganic substances and polymers), Standardization and Certification (chemical products) and even "Industry And Manufacturing Organization". The 2nd year students received a fundamental natural science education on a single curriculum (mathematics, physics, a number of chemical disciplines: inorganic chemistry, organic chemistry, analytical chemistry, and the beginning of engineering disciplines: engineering, technical mechanics, as well as the discipline "Introduction to specialty", where each graduate department told about their specialty and further employment).

When translated into 3 courses from the student chose a specific direction of the bachelor's degree (specialty), and this choice was carried out by competition: which was based on the indicators of the educational rating.

The third and fourth courses completed fundamental and engineering education (for undergraduate programs) – already with a focus on the areas of me and training profiles (modeling, physical chemistry, colloidal chemistry, quantum chemistry, general chemical technology (general biotechnology), electrical engineering, processes and

apparatuses of chemical (biotechnology) industries, the basics of automation of productions) and a number of special programs disciplines.

Admission to master's programs was based on the competition (on the results of entrance exams). [1, 2, 3, 4].

What has changed since then? New standards were introduced - FGOS. The learning process should be based on the Exemplary Basic Educational Programs (POP). To date, FGOS 3 in the direction of "Biotechnology" (both for bachelor's and for master's degree) is not approved, and we can only work with his project. The POOP is all the more unaccepted. What changes should be made to the FGOS project? How should I redo the POOP project?

The FGOS project seems to be unaltered. And in the project, the POOP envisages the formation of competences at every educational level.

The Coordinating Council for Education "Engineering, Technology and Technical Sciences" scheme for the implementation of undergraduate programs.

Given MITHT's experience. M.V. Lomonosov and other higher education institutions can expand the proposals of the Coordinating Council to give the right to universities:

1. Accept applicants for the first year in a single stream in areas with a close educational foundation (those whose curriculums for the first or first and second courses are largely the same).
2. Allow students to change the HSN group after the first year, if there are available places on educational programs.
3. To offer students of junior courses the study of elective and optional disciplines that deepen the material of fundamental disciplines.
4. Distribute students after the second year in the areas of training in accordance with the academic rating.
5. Form applied and academic profiles of the bachelor's degree and distribute them to students during the third year. Students of academic profiles are focused on continuing their studies in the master's degree. Students of applied profiles may have an extended duration of practices, including practices in alumni consumer organizations and companies.
6. Offer undergraduate students' additional study of academic disciplines in other areas and profiles using electronic and remote technologies.

References

1. Solomonov VA On the multi-level structure of basic educational programs. Higher education in Russia. 2010. No. 6. S. 41-48.
2. Pshenichnikova A.B., Bragina N.A., Biglov R.R., Bayramashvili D.I., Shvets V.I. System of training highly qualified specialists for the biopharmaceutical industry in MITCHT. M.V. Lomonosova. Biopharmaceutical Journal. 2010. T.2 No.
3. Frolkova A.K., Solomonov VA Development of a multi-level system of higher education. Reporting by MITCHT. Series: Social and Humanities and Ecology. 2014. T. 1. No. 1. S. 15-21.
4. Pshenichnikova A.B., Bragina N.A., Solomonov V.A., Biglov R.R., Shvets V.I. Training of highly skilled personnel for Innovative Biopharmaceutical Industry in MITCHT by M.V. Lomonosov. In the collection: of Materials VIII of the Moscow International Congress. 2015 S. 427-428.

УДК: 378.147 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-444-446

ПОДГОТОВКА МАГИСТРОВ-БИОТЕХНОЛОГОВ В РХТУ ИМ. Д.И.МЕНДЕЛЕЕВА ГЛАЗАМИ СТУДЕНТОВ: ОЖИДАНИЕ И РЕАЛЬНОСТЬ

Красноштанова А.А.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Россия
 125480, Россия, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20, корп. 1
 e-mail: aak28@yandex.ru

Проведен анализ опроса студентов, касающийся их ожиданий в отношении обучения в магистратуре. Установлено, что магистранты считают необходимость наличия в магистратуре дисциплин по выбору, практик, профессиональных стажировок в России и за рубежом.

Ключевые слова: болонский процесс, биотехнология, магистратура

Прошло уже более десяти лет с тех пор, как в России начала применяться болонская двухуровневая система высшего образования, предполагающая подготовку по программе бакалавриата (4 года), а далее – нацеленная на освоение профессиональных компетенций по выбранному направлению подготовки магистратура (2 года). Целью перестройки основ образовательного процесса явился переход к единым европейским стандартам, расширение мобильности, научных и карьерных возможностей как студентов, так преподавателей [1].

На кафедре биотехнологии с 2015 года ведется подготовка магистров по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология в соответствии с магистерской программой «Промышленная биотехнология и биоинженерия». Анализ приемных кампаний 2015-2019 гг показывает, что из выпускников бакалавриата, обучавшихся на кафедре биотехнологии по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология, около 50% планируют продолжать обучение в магистратуре. Доля выпускников кафедры биотехнологии составляет около 70% поступивших в магистратуру.

Опросы выпускников бакалавриата показали, что они принимают решение остановиться на первой ступени высшего образования под влиянием различных обстоятельств, таких как: необходимость работать, создание семьи, переезд в другой город, предпочтение практической деятельности перед научной и управленческой и т.д. Поэтому для нас представляло интерес выяснить, что ждут магистранты от обучения в магистратуре, какие цели ставят перед собой, какие преимущества и недостатки они видят в магистратуре РХТУ им. Д.И. Менделеева в сравнении с зарубежными университетами. В учебном плане магистерской программы «Промышленная биотехнология и биоинженерия» присутствует дисциплина «Методологические основы исследований в биотехнологии», при изучении которой студенты знакомятся с образовательными стандартами РФ, а также системами высшего образования в области биотехнологии зарубежных стран [2]. В ходе самостоятельной работы студенты готовят эссе, в котором сопоставляют систему подготовки магистров в РХТУ и в одном из зарубежных университетов (по выбору студента). Для проведения сравнительного анализа студентам предлагается ответить на ряд вопросов, а именно: сроки обучения в бакалавриате и магистратуре, доля общеобразовательных дисциплин в учебном плане (в том числе иностранного языка и гуманитарных дисциплин), наличие курсов по выбору студента, практик, стажировок (их связь с выпускными квалификационными работами и будущим местом работы), возможность изучения в течение 1-2 семестров профильных дисциплин в другом вузе с зачетом набранных кредитов по основному месту учебы. В результате анализа работ студентов было установлено, что большинство из них (более 75%) хотели бы во время учебы в магистратуре сосредоточиться на изучении профильных дисциплин, иметь возможность выбирать дисциплины, соответствующие выбранной тематике магистерской диссертации или направлению будущей профессиональной деятельности, проходить стажировки и практики, в том числе и за рубежом.

Литература

1. Реформирование биотехнологического образования на основе Болонского процесса: методическое пособие : в 3 т. Т.1 /Под ред. А.Е. Кузнецова / А. Астромскиене, Е. С. Бабусенко, Д. В. Баурин и др. – Лаборатория знаний Москва, 2016. – 394 с.
2. Реформирование биотехнологического образования на основе Болонского процесса : методическое пособие : в 3 т. Т. 2 / под ред. А. Е. Кузнецова / А. Астромскиене, Е. С. Бабусенко, Д. В. Баурин и др. – Лаборатория знаний Москва, 2016. – 586 с.

UDC: 378.147 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-444-446

TRAINING OF MASTER BIOTECHNOLOGISTS IN D. MENDELEEV UNIVERSITY OF CHEMICAL TECHNOLOGY OF RUSSIA THROUGH THE EYES OF STUDENTS: EXPECTATION AND REALITY

Krasnoshtanova A.A.

D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia,
125480, Russia, Moscow, 20 Heroes Panfilovtsev Str., c. 1
e-mail: aak28@yandex.ru

An analysis of the survey of students concerning their expectations for master's studies has been carried out. It has been established that master's students consider it necessary to have in master's degree disciplines of choice, practices, professional internships in Russia and abroad.

Key words: Bologna process, biotechnology, master 's degree

It has been more than ten years since the Bologna twotier system of higher education began to be applied in Russia, which involves training in the baccalaureate program (4 years), and further aimed at mastering professional competences in the chosen direction of master 's degree training (2 years). The aim of restructuring the foundations of the educational process was to move to-wards common European standards, to increase mobility, scientific and career opportunities for both students and teachers [1].

Since 2015, the Department of Biotechnology of D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia has been training masters in the field of training 19.04.01 Biotechnology in accordance with the master 's program Industrial Biotechnology and Bioengineering. Analysis of acceptance campaigns 2015-2019 shows that of the graduates of bachelor 's degree who studied at the Department of Biotechnology in the direction of training 19.03.01 Biotechnology, about 50% plan to continue their studies in master 's degree. The share of graduates of the Department of Biotechnology is about 70% of those admitted to the master 's degree.

Surveys of bachelor 's graduates have shown that they decide to stop at the first level of higher education under the influence of various circumstances, such as the need to work, the creation of a family, the move to another city, the preference of practical activities over scientific and managerial, etc. Therefore, it was of interest for us to find out what the master 's degrees are waiting for from studying in the master 's degree, what goals they set for themselves, what advantages and disadvantages they see in the master 's degree of D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia in comparison with foreign universities. In the curriculum of the Master 's program "Industrial Biotechnology and Bioengineering" there is a discipline "Methodological Ba-ses of Research in Biotechnology," during which students are acquainted with educational stand-ards of the Russian Federation, as well as systems of higher education in the field of biotechnology of foreign countries [2].

During their independent work, students prepare an essay comparing the master 's training system at the D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia and at a foreign university (at the student 's choice). For comparative analysis, students are asked to answer a number of ques-tions, namely: courses in bachelor 's and master 's degrees, share of general education disciplines in the curriculum (including foreign language and humanitarian disciplines), availability of courses on student 's choice, practices, internships (their connection with graduate qualification works and future place of work), possibility to study during 1-2 semesters of subject disciplines in an-other university with credits at the main place of study.

As a result of the analysis of the students 'work, it was found that most of them (more than 75%) would like to focus on studying subject subjects during their master 's studies, to be able to choose disciplines corresponding to the chosen subject of master 's thesis or the direction of fu-ture professional activity, to undergo internships and practices, including abroad.

References

1. Reform of biotechnology education on the basis of the Bologna process: methodological man-ual: in 3 tons. T.1/ Under ed. A.E. Kuznetsov/A. Astromskiene, E. S. Babusenko, D. V. Baurin, etc. – Knowledge Laboratory Moscow, 2016. – 394 p.
2. Reform of biotechnological education based on the Bologna process: methodological manual: in 3 vol. T. 2/under ed. A. E. Kuznetsova/A. Astromskiene, E. S. Babusenko, D. V. Baurin et al. – Knowledge Laboratory Moscow, 2016. – 586 p.

УДК 663.1 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-446-448

ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕРНОЙ ОСНОВНОЙ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАМ-МЫ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПО ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ В СВЯЗИ С АКТУАЛИЗАЦИЕЙ ФГОС ВО 3++

Мезенова О.Я., Агафонова С.В.

ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет», Калининград, Россия
 236022, Калининград, Советский проспект, 1
 e-mail: mezenova@kltgu.ru

Рассмотрены аспекты разработки примерных основных образовательных программ по пищевым и биотехнологическим направлениям в соответствии с требованиями ФГОС 3++ и профессиональных стандартов

Ключевые слова: ФУМО, образовательные стандарты, образовательные программы

Примерная основная образовательная программа (ПООП) является основной учебнометодической документацией, которая включает примерный учебный план и календарный учебный график, регламентирует объем и содержание образования определенного уровня и планируемые результаты освоения образовательной программы. ПООП устанавливает также перечень компетенций, обеспечиваемых дисциплинами и практиками, а также индикаторы достижения этих компетенций, которые являются обязательными для учета образовательной организацией. Немаловажным аспектом при разработке ПООП на основе актуализированных федеральных государственных образовательных стандартов (ФГОС 3++) является учет требований профессиональных стандартов.

Актуализацию ФГОС и разработку ПООП на их основе по пищевым и биотехнологическим направлениям координирует отделение пищевых технологий и биотехнологии при ФУМО по УГСН 19.00.00 «Промышленная экология и биотехнология». Научнометодическими советами, входящими в состав отделения, актуализированы ФГОС по направлениям подготовки бакалавриата и магистратуры: 19.03.01 и 19.04.1 Биотехнология, 19.03.02 и 19.04.02 Продукты питания из растительного сырья, 19.03.03 и 19.04.03 Продукты питания животного происхождения, 19.03.04 и 19.04.04 Технология продукции и организация общественного питания, 19.04.05 Высокотехнологичные производства пищевых продуктов функционального и специализированного назначения, а также разработан новый образовательный стандарт по направлению 19.03.05. В перечисленных проектах ФГОС 3++ разработаны универсальные и общепрофессиональные компетенции, индикаторы их достижения, сформулированы типы практик, требования к кадровым и финансовым условиям реализации образовательного процесса. В соответствии с поручением Президента РФ проекты всех стандартов были скорректированы с учетом приоритетов научно-технологического развития РФ.

В настоящее время отделением пищевых технологий и биотехнологии ФУМО по УГСН 19.00.00 ведется разработка проектов ПООП на основе ФГОС 3++. Особенностью актуализированных ПООП является раскрытие в них областей и сфер профессиональной деятельности, типов профессиональных задач, обязательных и рекомендуемых профессиональных компетенций. Во ФГОС 3++ сформулированы универсальные и общепрофессиональные компетенции.

В проекте ПООП по направлению 19.03.01 Биотехнология, профиль Пищевая биотехнология сформулированы обязательные и рекомендуемые профессиональные компетенции выпускников в соответствии с типами задач профессиональной деятельности, а также соответствующие индикаторы. Предлагаемые типы задач: научно-исследовательский, организационно-управленческий, технологический, проектный, педагогический. При подготовке кадров по пищевой биотехнологии важнейшим является технологический тип задач, в соответствии с которым должны быть сформирован ряд значимых профессиональных компетенций. Выпускники, освоившие образовательную программу данного профиля, должны быть способны принимать участие в проведении исследований в области оценки безопасности кормовой и пищевой биотехнологической продукции; осуществлять технологический процесс глубокой переработки сельскохозяйственного сырья и отходов, промысловых гидробионтов и продукции аквакультур, пищевого сырья, производства кормовых биологически активных компонентов, добавок и продуктов, использовать технические средства для измерения основных параметров биотехнологических процессов, свойств сырья и продукции; контролировать качество биотехнологической продукции на всех этапах производственного процесса.

UDK 663.1 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-446-448

FEATURES OF THE APPROXIMATE BASIC EDUCATIONAL PROGRAM OF HIGHER EDUCATION IN FOOD BIOTECHNOLOGY IN CONNECTION WITH THE UPDATING OF THE FGOS 3++

Mezenova O.J., Agafonova S.V.

*Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russia
236022, Kaliningrad, Soviet Avenue 1
e-mail: mezenova@klgtu.ru*

Aspects of the development of approximate basic educational programs in food and technological areas in accordance with the requirements of the FGOS 3++ and professional standards are considered

Key words: FUMO, educational standards, educational programs

The approximate basic educational program (POOP) is the main educational and methodical documentation that includes an approximate curriculum and calendar training schedule, regulates the volume and content of education at a certain level and the planned results of the development of the educational program. POOP also establishes a list of competencies provided by disciplines and practices, as well as indicators of achievement of these competencies, which are mandatory for accounting by an educational organization. An important aspect when developing POOP based on updated Federal state educational standards (FGOS 3++) is taking into account the requirements of professional standards.

Updating of FGOS and development of POOP based on them in food and biotechnological areas is coordinated by the Department of food technologies and biotechnologies at the FUMO under the UGSN 19.00.00 "Industrial ecology and biotechnology". Scientific and methodological councils that are part of the Department updated the FGOS for bachelor's and master's degree courses: 19.03.01 and 19.04.1 Biotechnology, 19.03.02 and 19.04.02 Food products from vegetable raw materials, 19.03.03 and 19.04.03 Food products of animal origin, 19.03.04 and 19.04.04 Production technology and catering, 19.04.05 High-Tech food production for functional and specialized purposes, as well as developed a new educational standard in the direction of 19.03.05.

The listed draft FGOS 3++ developed universal and General professional competencies, indicators of their achievement, formulated types of practices, requirements for personnel and financial conditions for the implementation of the educational process. In accordance with the instructions of the President of the Russian Federation, all draft standards were adjusted to take into account the priorities of scientific and technological development of the Russian Federation.

Currently, the Department of food technology and biotechnology of the FUMO 19.00.00 is developing draft POOP based on FGOS 3++. The peculiarity of the updated POOP is the disclosure of spheres and areas of professional activity, types of professional tasks, mandatory and recommended professional competencies. The FGOS 3++ formulate universal and general professional competences.

The draft POOP in the direction of 19.03.01 Biotechnology, profile Food biotechnology formulated mandatory and recommended professional competencies of graduates in accordance with the types of tasks of professional activity, as well as relevant indicators. The proposed types of tasks: research, organizational and managerial, technological, project, and pedagogical. When training specialists in food biotechnology, the most important is the technological type of tasks, according to which a number of significant professional competencies must be formed. Graduates who have mastered the educational program of this profile should be able to participate in research in the field of assessing the safety of feed and food biotechnological products; to carry out the technological process of deep processing of agricultural raw materials and waste, commercial hydrobionts and aquaculture products, food raw materials, production of feed biologically active components, additives and products. They must be able to use technical means to measure the main parameters of biotechnological processes, properties of raw materials and products, and control the quality of biotechnological products at all stages of the production process.

УДК 378.048.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-448-450

ПЯТИЛЕТНИЙ ОПЫТ РЕАЛИЗАЦИИ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ ПОДГОТОВКИ КАДРОВ ВЫСШЕЙ КВАЛИФИКАЦИИ В ФИЦ БИОТЕХНОЛОГИИ РАН

Титова Е.С., Камионская А.М., Шишкин С.С.

*Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2
e-mail: es_titova@inbox.ru*

Представлены описание и результаты реализации образовательной программы подготовки кадров высшей квалификации в ФИЦ Биотехнологии РАН. Охарактеризованы основные элементы функционирования учебного цикла подготовки аспирантов по направлению 06.06.01 Биологические науки.

Ключевые слова: аспирантура, высшая школа, проектирование образовательной программы, учебный цикл

На рубеже XX и XXI веков появилась грандиозная по объему и принципиально важная биологическая информация о практически полной нуклеотидной последовательности генома человека, а также о содержащихся в ней генах, свойствах этих генов, об образующихся транскриптах, о кодируемых белках и

многих других биохимических характеристик. Соответствующие материалы суммированы в виде различных общедоступных баз данных и других информационных источников. В данной связи возникает потребность сориентировать вектор развития образовательного процесса на имеющиеся современные методы исследований, тенденции образовательных и информационных технологий. Траектория движения при этом должна укладываться в требования отраслевых министерств и ведомств, утвержденного образовательного стандарта и прочих нормативно-правовых актов.

С учетом этого и предыдущего многолетнего опыта, в 2015 г. в ФИЦ Биотехнологии РАН была сформирована образовательная программа подготовки кадров высшей квалификации, которая включает 5 профилей в соответствии с применяемой в РФ классификацией научных специальностей: биохимия; молекулярная биология; биотехнология (в том числе бионанотехнологии); математическая биология, биоинформатика; микробиология.

В соответствии с государственным образовательным стандартом объем программы составляет 240 зачетных единиц, рассчитана программа на четырехлетний период обучения. Отдельные ключевые точки контроля учебной и научной работы обучающихся, а также обобщенная схема организации ежегодной отчетной конференции аспирантов показаны на рис. 1.

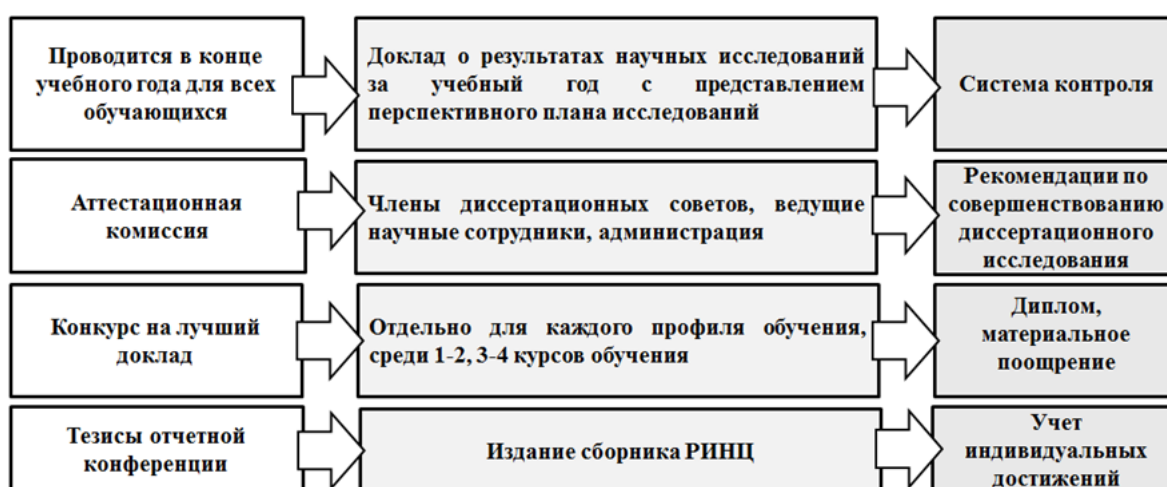


Рис. 1. Обобщенная схема организации ежегодной отчетной конференции аспирантов

К настоящему времени в результате завершения двух полных циклов работы по программе с момента введения федерального государственного образовательного стандарта (выпуск 2018-2019 гг.), 19 аспирантов получили дипломы об окончании аспирантуры.

Показано также, что разработанная программа успешно интегрируется в существующую в ФИЦ Биотехнологии РАН систему управления образовательной деятельностью, охватывающую работу со школьниками, студентами и аспирантами.

UDK 378.048.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-448-450

FIVE-YEAR EXPERIENCE IMPLEMENTATION OF POSTGRADUATE EDUCATION PROGRAM IN THE RESEARCH CENTRE OF BIOTECHNOLOGY RAS

Titova E.S., Kamionskaya A.M., Shishkin S.S.

Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119071, Moscow, Leninsky Prospekt 33, bld. 2
e-mail: es_titova@inbox.ru

The description and results of the postgraduate education program's implementation at the Research Centre of Biotechnology RAS are presented. The postgraduate program educational cycle functioning basic elements in the direction 06.06.01 Biological sciences are characterized.

Key words: postgraduate education program, high school, curriculum design, educational cycle.

At the turn of the 20th and 21st centuries, grandiose in volume and fundamentally important biological information on the almost complete nucleotide sequence of the human genome, as well as on the genes contained in it, about the properties of these genes, about transcripts, about encoded proteins and many other biochemical characteristics, has appeared. Relevant materials were summarized in the form of various publicly available databases and other information sources. In this regard, there is a need to orient the vector of the educational process development on the available modern research methods, trends in educational, and information technologies. In this case, the trajectory of the movement should fit into the requirements of branch ministries and departments, the approved educational standard and other regulatory legal acts.

Based on current and previous many years of experience, in 2015, the Research Centre of Biotechnology RAS formed a postgraduate educational program, which includes 5 profiles in accordance with the classification of scientific specialties used in the Russian Federation: biochemistry; molecular biology; biotechnology (including bionanotechnology); mathematical biology, bioinformatics; microbiology.

In accordance with the state educational standard, the volume of the program is 240 cred-its; the program is designed for a four-year period. Certain key control points of postgraduate student's educational and scientific work, as well as a general scheme of postgraduate student's annual report conference organization, are shown in fig. 1.

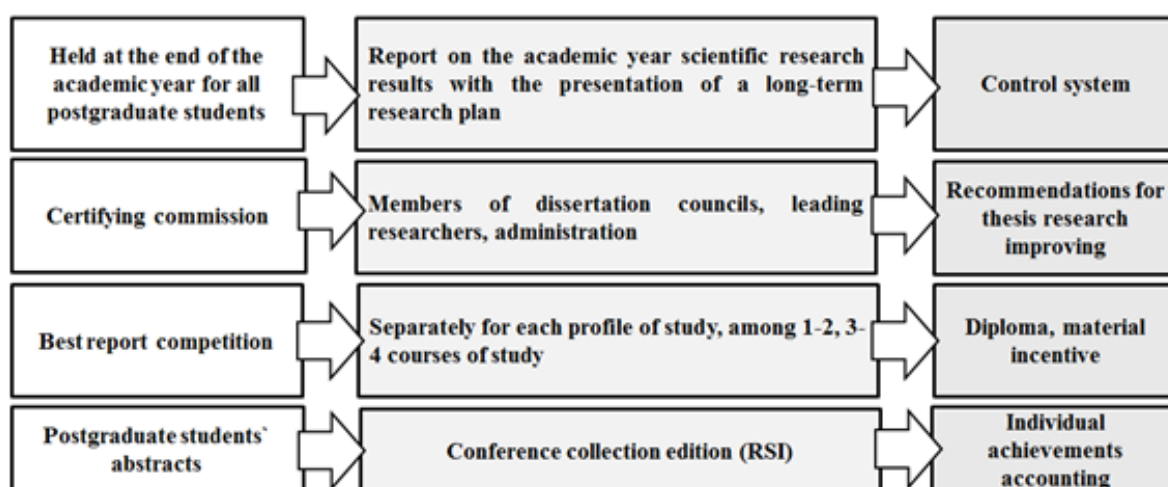


Fig. 1. General scheme of postgraduate students' annual reporting conference organization

To date, as a result of two full cycles of the program completion, since the introduction of the federal state educational standard (graduation 2018-2019), 19 postgraduate students have received diplomas.

It is also shown that the developed program is successfully integrated into the educational management system existing at the Research Centre of Biotechnology RAS, covering work with schoolchildren, undergraduate and postgraduate students.

УДК 378.141.4 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-450-452

АКТУАЛИЗАЦИЯ ОПОП ПО НАПРАВЛЕНИЮ ПОДГОТОВКИ 19.03.01 БИОТЕХНОЛОГИЯ С НАПРАВЛЕННОСТЬЮ «БИОТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ» С УЧЕТОМ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

О.В. Топкова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия
 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.14
 oxana.topkova@pharminnotech.com

Выбраны соответствующие профессиональные стандарты и актуализирована основная профессиональная образовательная программа по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология с направленностью «Биотехнология лекарственных средств».

Ключевые слова: профессиональные стандарты, ОПОП, актуализация ОПОП.

В соответствии с Федеральным законом от 29 декабря 2012 г. № 273-ФЗ «Об образовании в Российской Федерации» (ч.7 ст.11) формирование требований ФГОСов к результатам освоения основных профессиональных образовательных программ (ОПОП) в части профессиональных компетенций должно осуществляться на основе соответствующих профессиональных стандартов [1]. Методические рекомендации Министерства образования и науки по разработке ОПОП закрепляют использование профстандартов в качестве обязательного условия разработки программ (модулей, частей программ), а также предлагают основной алгоритм пошаговой разработки ОПОП с учетом требований профессиональных стандартов [2].

В соответствии с Методическими рекомендациями нами была актуализирована основная профессиональная образовательная программа по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология с направленностью «Биотехнология лекарственных средств». Из числа профессиональных стандартов, имеющих в Национальном реестре [3], были выбраны те, которые полностью или частично отражают специфику деятельности специалистов биофармацевтической промышленности: 02.010 «Специалист по промышленной фармации в области исследований лекарственных средств», 02.011 «Специалист по валидации (квалификации) фармацевтического производства», 02.013 «Специалист по промышленной фармации в области контроля качества лекарственных средств», 02.014 «Специалист по промышленной фармации в области обеспечения качества лекарственных средств», 02.016 «Специалист по промышленной фармации в области производства лекарственных средств», 26.009 «Специалист-технолог по производству моющих и чистящих средств биотехнологическим методом», 26.013 «Специалист по контролю качества биотехнологического производства препаратов для растениеводства», 40.010 «Специалист по техническому контролю качества продукции», 40.011 «Специалист по научно-исследовательским и опытно-конструкторским разработкам». Были соотнесены профессиональные задачи по каждому виду деятельности из федерального государственного образовательного стандарта 3+ (ФГОС 3+) 19.03.01 Биотехнология с трудовыми функциями по всем обобщенным трудовым функциям из выбранных профстандартов.

Далее нами были сформированы результаты освоения программы с учетом профстандартов, сформулированы индикаторы достижения компетенций. При формировании структуры и содержания программы путем соотнесения содержания ПК ФГОС 3+ и трудовых функций профстандартов был определен перечень дисциплин, необходимых в процессе обучения бакалавров. С учетом введения в недалеком будущем ФГОС 3++, содержащего универсальные компетенции (УК), мы вынесли в базовую часть учебного плана дисциплины, формирующие УК, в частности, дисциплины «Культурология», «Культура русской речи», «Конфликтология», «Правоведение».

На основании актуализированного учебного плана была проведена и актуализация рабочих программ дисциплин, практик, итоговой аттестации и фондов оценочных средств (ФОС) результатов обучения. Актуализированные ФОС были представлены на рецензию представителям работодателей, а также в образовательную организацию высшего образования, осуществляющую образовательную деятельность по аналогичному направлению подготовки. Все полученные рецензии имели положительные оценки.

Литература

1. ФЗ от 29 декабря 2012г. № 273-ФЗ «Об образовании в Российской Федерации» [Электронный ресурс] URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_140174 (дата обращения 12.02.2020).
2. Методические рекомендации по разработке основных профессиональных образовательных программ и дополнительных профессиональных программ с учетом соответствующих профессиональных стандартов, утвержденных Министерством образования и науки России 22 января 2015 г. № ДЛ.1/05 вн [Электронный ресурс]. URL : <http://www.consultant.ru/cons/cgi/online> (дата обращения 12.02.2020).
3. Национальный реестр профессиональных стандартов [Электронный ресурс]. URL: <http://profstandart.rosmintrud.ru/> (дата обращения 12.02.2020).

UDC 378.141.4 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-450-452

ACTUALIZATION OF THE BASIC PROFESSIONAL EDUCATIONAL PROGRAMS ON THE DIRECTION OF PREPARATION 19.03.01 BIOTECHNOLOGY WITH AN ORIENTATION «BIOTECHNOLOGY OF MEDICINES» TAKING INTO ACCOUNT PROFESSIONAL STANDARDS

O.V. Topkova

*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «St. Petersburg State University of Chemical and Pharmaceuticals», St. Petersburg, Russia
 197376, St. Petersburg, Professor Popov Street, 14*

Corresponding professional standards were selected and the main professional educational program in the direction of preparation was updated 19.03.01 Biotechnology with an orientation on «Biotechnology of medicines».

Key words: professional standards, OPOP, updating of OPOP.

In accordance with Federal Law of December 29, 2012 No. 273-FL "On Education in the Russian Federation" (Part 7 of Article 11), the formation of the requirements of the Federal State Educational Standards for the results of mastering basic professional educational programs (BPEP) in terms of professional competencies should be carried out on based on relevant professional standards [1]. Methodological recommendations of the Ministry of Education and Science on the development of OPOP consolidate the use of professional standards as a prerequisite for the development of programs (modules, parts of programs), and also it offer the basic algorithm for the step by step development of BPEP with the requirements of professional standards [2].

In accordance with the Methodological Recommendations, we have updated the main professional educational program in the direction of preparation 19.03.01 Biotechnology with the focus on «Biotechnology of medicines». Among the professional standards available in the National Register [3], those were selected that fully or partially reflect the specifics of the specialists of biopharmaceutical industry specialists: 02.010 «Specialist in industrial pharmacy in the field of drug research», 02.011 «Specialist in validation (qualification) of pharmaceutical production», 02.013 «Specialist in industrial pharmacy in the field of quality control of medicines», 02.014 «Specialist in industrial pharmacy in the field of quality assurance medicines», 02.016 «Specialist in industrial pharmacy in the field of pharmaceutical production», 26.009 «Specialist technologist for the production of detergents and cleaning products using the biotechnological method», 26.013 «Specialist in quality control of the biotechnological production of medicines for crop production», 40.010 «Specialist in technical product quality control», 40.011 «Specialist in research and development». Professional tasks for each type of activity from the federal state educational standard 3+ (FSES 3+) were correlated 19.03.01 Biotechnology with labor functions for all generalized labor functions from selected professional standards.

Then we have formed the results of mastering the program, taking into account professional standards, formulated indicators of competency achievement. When forming the structure and content of the program by correlating the content of the FSES 3+ PC and the labor functions of professional standards, a list of disciplines required in the process of bachelor's studies was determined. Taking into account the introduction in the near future of FSES 3 ++, which contains universal competencies (UC), we have taken into the basic part of the curriculum the disciplines that form the UC, in particular the disciplines of «Culturology», «Culture of Russian Speech», «Conflictology», «Jurisprudence».

On the basis of the updated curriculum, the work programs of disciplines, practices, final certification and assessment funds (FCAF) of learning outcomes were updated. Updated FCAF were submitted for review to representatives of employers, as well as to an educational institution of higher education that carries out educational activities in a similar area of training. All reviews received were positive.

References

1. Federal Law of December 29, 2012 No. 273-ФЗ «On Education in the Russian Federation» [Electronic resource] URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_140174 (accessed 12.02.2020).
2. Methodological recommendations for the development of basic professional educational programs and additional professional programs, taking into account relevant professional standards approved by the Ministry of Education and Science of Russia on January 22, 2015 No. DL.-1/05 int [Electronic re-source]. URL: <http://www.consultant.ru/cons/cgi/online> (accessed 12.02.2020).
3. National Register of Professional Standards [Electronic resource]. URL: <http://profstandart.rosmintrud.ru/> (accessed 12.02.2020).

БИОТЕХНОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY

| | |
|---|-----|
| 1. МЕТАБОЛОМНЫЙ АНАЛИЗ В ДИАГНОСТИКЕ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ Щербаклова Е. С., Салль Т. С., Вахитов Т. Я., Ситкин С. И., Демьянова Е. В..... | 453 |
| ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE: PILOT STUDY Shcherbakova E.S., Sall T.S., Vakhitov T.Ya., Sitkin S. I., Demyanova E.V..... | 454 |
| 2. ПРЕЦИЗИОННАЯ АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА ПОДДЕРЖАНИЯ ДАВЛЕНИЯ ДЛЯ МИКРОФЛЮИДНОЙ ЛАБОРАТОРИИ НА ЧИПЕ В.В.Ечеистов, А.В.Зверев, В.В.Рыжков, И.А.Рыжиков, В.А.Шахнов, И.А.Родионов..... | 455 |
| PRECISION AUTOMATED PRESSURE MAINTENANCE SYSTEM FOR MICROFLUIDIC LAB-ON-CHIP V.Echeistov, A.Zverev, V.Ryzhkov, I.Ryzhikov, V.Shakhnov, I.Rodionov | 456 |
| 3. ИНТЕГРИРОВАННЫЙ МИКРОФЛЮИДНЫЙ СЕНСОР ПОТОКА ДЛЯ ЛАБОРАТОРИЙ НА ЧИПЕ И УСТРОЙСТВ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ Рыжков В.В., Зверев А.В., Андроник М., Ечеистов В.В., Исабаева Ж., Сорокина О.С., Константинова Т., Лотков Е.С., Рыжиков И.А. и Родионов И.А..... | 457 |
| INTEGRATED MICROFLUIDIC FLOW SENSOR FOR LAB-ON-CHIP AND POINT-OF-CARE APPLICATIONS Ryzhkov V.V., Zverev A.V., Andronik M., Echeistov V.V., Issabayeva Z., Sorokina O.S., Konstantinova T., Lotkov E.S., Ryzhikov I.A., Rodionov I.A..... | 457 |
| 4. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАЛО РАСПРОСТРАНЕННЫХ РАСТЕНИЙ СОЧИНСКОГО ПРИЧЕРНОМОРЬЯ В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СУБСТАНЦИЙ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ Шмат Е.В., Рыбалко А.А., Рыбалко А.Е., | 458 |
| PROSPECTS FOR USAGE THE RARE PLANTS OF THE SOCHI BLACK SEA REGION AS THE SOURCES OF MEDICINAL SUBSTANCES FOR THE TREATMENT OF ONCOLOGICAL DISEASES Shmat E.V., Rybalko A.A., Rybalko A.E. | 460 |

УДК 543.544 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-453-455

МЕТАБОЛОМНЫЙ АНАЛИЗ В ДИАГНОСТИКЕ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Щербаклова Е. С., Салль Т. С., Вахитов Т. Я., Ситкин С. И., Демьянова Е. В.

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

С использованием газовой хроматографии масс-спектрометрии проведён полный метаболомный анализ сыворотки крови пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени на стадиях стеатоза и стеатогепатита, а также здоровых добровольцев.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени, НАЖБП, метаболом, ГХ-МС, биомаркеры.

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) – одно из наиболее распространённых в мире хронических заболеваний печени. НАЖБП страдает 25% взрослого населения планеты (от 13,5% в Африке и до 31,8% на Ближнем Востоке) [1]. Начальная стадия - стеатоз, характеризуется избыточным накоплением триглицеридов и может прогрессировать до неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), сопровождающегося развитием воспаления в гепатоцитах.

Цель работы - с помощью метаболомного анализа сыворотки крови выявить низкомолекулярные биомаркеры НАЖБП.

В исследовании принимали участие 25 пациентов мужского пола возраста 49±5 лет с ИМТ = 30,89±2,84 кг/м², из них четыре человека – практически здоровые, десять человек – пациенты со стеатозом, одиннадцать человек – пациенты с НАСГ (подтвержденным биопсией). Диагноз у пациентов устанавливали на основании лабораторных,

инструментальных и неинвазивных методов исследований. Исследование состава метаболома сыворотки крови пациентов осуществляли с помощью ГХ-МС на приборе GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Япония) с последующей обработкой хроматограмм в программах MetAlign и Aloutput. Идентификацию веществ проводили на основании анализа спектральной информации и с помощью метаболомных баз данных (NIST, HMDB, Golm MD). Соединения аннотировали по их масс-спектру, индексу и времени удерживания. Методом главных компонент проводили оценку различий метаболома между группами. Выявление биомаркеров проводили с использованием классификаторов - PLS-DA, SVM, Naive bayes. Статистическую значимость в различии уровня биомаркеров между группами оценивали по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни. Для оценки диагностической ценности кандидатных биомаркеров НАЖБП строили ROC-кривые и вычисляли показатель площадь под кривой (AUC).

При разделении групп пациентов со стеатозом и здоровых добровольцев методом SVM (AUC = 0,961) было выявлено десять кандидатных биомаркеров, содержание 9 из них возрастало у пациентов со стеатозом. Среди предполагаемых маркеров стеатоза, уровень которых был повышен в крови, были выявлены: ксилопираноза (в 20,2 раза), 3-гидроксимасляная кислота (в 6,6 раза), арабитол (в 12,9 раз). При разделении групп пациентов с НАСГ и здоровых добровольцев методом SVM (AUC = 0,788) наблюдали достоверно значимые повышения содержания 2-гидроксимасляной кислоты (в 9,2 раз), арабитола (в 18,8 раза) и неидентифицированных соединений 13,29_101; 105; 116 (время удерживания, мин_характеристические ионы) (в 3,1 раза), 21,22_100;109;126 (в 3,6 раза) и 19,35_129;147;157 (в 108,2 раза). При разделении групп пациентов со стеатозом и НАСГ с помощью PLS-DA (AUC = 0,992) было выявлено несколько значимых для диагностики соединений. В крови больных НАСГ по сравнению с больными стеатозом увеличивались уровни 3-метил-2-оксовалериановой кислоты (в 6,8 раз), неидентифицированных соединений 21,22_126;147;156 (в 2,3 раза), 15,39_156;172;188 (в 4,7 раза) и 8,37_102;147;207 (в 1,5 раза).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ (№ МК-2429.2020.4).

Литература

1. Younossi Z.M., Marchesini G., Pinto-Cortez H., Petta S. *Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: implications for liver transplantation //Transplantation. 2019. Vol. 103. №. 1. P. 22-27.*

UDC 543.544 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-453-455

METABOLOMIC ANALYSIS IN THE DIAGNOSTICS OF A NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE: PILOT STUDY

Shcherbakova E.S., Sall T.S., Vakhitov T.Ya., Sitkin S. I., Demyanova E.V.

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

Using gas chromatography-mass spectrometry, a complete metabolomic analysis of blood serum of patients with non-alcoholic fatty liver disease at the stages of steatosis and steatohepatitis, as well as healthy volunteers, was carried out.

Key words: non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD, metabolome, GC-MS, biomarkers .

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common chronic liver diseases in the world. NAFLD affects 25% of the world's adult population (from 13,5% in Africa to 31,8% in the Middle East) [1]. The initial stage is steatosis, characterized by an excessive accumulation of triglycerides and can progress to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) accompanied by the development of inflammation in hepatocytes.

The aim of this work is to identify low molecular weight biomarkers of NAFLD using metabolomic analysis of blood serum.

The study involved 25 male patients aged 49±5 years with BMI = 30,89±2,84 kg/m², of which four people were practically healthy, ten people were patients with steatosis, eleven people were patients with NASH (confirmed biopsy). The diagnosis of patients was established with laboratory, instrumental and non-invasive research methods. The study of the composition of the metabolome of the blood serum of patients was carried out using GC-MS on a GCMS-QP2010 Plus instrument (Shimadzu, Japan) with subsequent processing of chromatograms in the MetAlign and Aloutput programs. Identification of substances was revealed based on the analysis of spectral information and using metabolic databases (NIST, HMDB, Golm Metabolome Database). Compounds were annotated by their mass spectrum, retention index and retention time. Statistical significance between groups was assessed by nonparametric Mann-Whitney U test. The method of principal component analysis was used to assess the differences in the metabolome between the groups. Biomarkers were identified using classifiers - PLS-

DA, SVM, Naive bayes. The statistical significance in the difference in the level of biomarkers between groups was assessed by the nonparametric Mann-Whitney U-test. To assess the diagnostic value of candidate biomarkers for NAFLD, ROC curves were constructed and area under the curve (AUC) was calculated.

When separating groups of patients with steatosis and healthy volunteers by the SVM method (AUC = 0,961), ten candidate biomarkers were identified, the content of 9 of them increased in patients with steatosis. Among the putative markers of steatosis, the level of which was increased in the blood, were identified: xylopyranose (20,24 times), 3-hydroxybutyric acid (6,62 times), arabitol (12,85 times). When separating groups of patients with NASH and healthy volunteers by the SVM method (AUC = 0,788), significantly increases increases in content of 2-hydroxybutyric acid (9,2 times), arabitol (18,8 times) and unidentified compounds 13,29_101; 105; 116 (retention time, min_characteristic ions) (3.1 times). 21,22_100;109;126 (3.6 times) and 19,35_129;147;157 (108.2 times) were observed. When separating groups of patients with steatosis and NASH using PLS-DA method (AUC = 0,992), several significant compounds were identified. In the blood of patients with NASH, compared with patients with steatosis, the levels of 3-methyl-2-oxovaleric acid (6,8 times), unidentified compounds 21,22 _ 126;147;156) (2,3 times), 15.39_156;172;188) (4,7 times) and 8,37_102;147;207) (1,5 times) increased.

This work was financially supported by the grant of the President of the Russian Federation (№ MK-2429.2020.4).

References

1. Younossi Z.M., Marchesini G., Pinto-Cortez H., Petta S. *Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: implications for liver transplantation //Transplantation. 2019. Vol. 103. №. 1. P. 22-27.*

УДК: 681.533.36 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-455-456

ПРЕЦИЗИОННАЯ АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА ПОДДЕРЖАНИЯ ДАВЛЕНИЯ ДЛЯ МИКРОФЛЮИДНОЙ ЛАБОРАТОРИИ НА ЧИПЕ

В.В.Ечеистов¹, А.В.Зверев¹, В.В.Рыжков², И.А.Рыжиков³, В.А.Шахнов², И.А.Родионов¹

¹ ФГУП «ВНИИА им. Н.Л. Духова», Россия, 127055, Москва, Суцневская, 22
e-mail: wecheistov@bmstu.ru, +7 (985) 383-73-79

² МГТУ им. Н.Э.Баумана, Россия, 105005, Москва, 2-я Бауманская, д. 5, стр. 1

³ Институт теоретической и прикладной электродинамики Российской академии наук (ИТПЭ РАН), Россия, 125412, Москва, Ижорская, 13

Проблема управления потоками малых объемов жидкостей является лимитирующим фактором для эксплуатации микрофлюидной лаборатории на чипе в биомедицинских устройствах нового поколения. В работе представлен результат разработки системы прецизионной подачи реагентов в устройства типа «лаборатория-на-чипе», применяемых для проведения многостадийных биохимических анализов.

Ключевые слова: микрофлюидика, лаборатория-на-чипе, микрофлюидный чип, система поддержания давления.

Современные микрофлюидные технологии получили широкое распространение в биологических и медицинских исследованиях, поскольку позволяют осуществлять уникальные высокоточные манипуляции и многостадийные реакции в сверхмалых объемах, вплоть до операций с одиночными объектами. Развитие микрофлюидных технологий сделало возможным создание лаборатории на чипе – компактного устройства с системой взаимосвязанных микроканалов, по которым перемещается жидкость или газ. Лаборатория на чипе обладает обширным спектром преимуществ, среди которых сокращение потребления реагентов, минимизация габаритов и массы относительно существующих систем, низкое энергопотребление, высокое быстродействие, исключение человеческого фактора при проведении анализа. Для использования устройств типа «лаборатория на чипе» необходима высокоточная система управления потоком, способная гарантировать точечную доставку проб и реагентов. Наиболее эффективными системами управления потоком в плане изготовления и эксплуатации являются системы, основанные на эффекте разности давлений, для обеспечения работы которых требуется наличие прецизионной многоканальной системы управления давлением с малым временем отклика. Система управления должна обеспечивать установку давления с точностью в единицы мбар, поскольку малейшая погрешность приводит к существенному изменению скорости движения пробы от расчетного режима, что является критичным при проведении ряда анализов, в которых требуется обеспечить доставку пробы к измерительному устройству точно в нужный момент времени. Спроектирована система поддержания давления, обеспечивающая точность

поддержания давления не хуже ± 1 мбар. Система состоит из трех основных блоков: пневматический блок, содержащий исполнительные механизмы (насос, клапан), аналогово-цифровой блок и вычислительный блок, обрабатывающий сигнал с аналогово-цифрового блока и управляющий пневматическим блоком. В алгоритме вычислительного блока предусмотрена адаптивная регулировка управляющего воздействия, что позволяет использовать систему поддержания при решении задач с различными пневматическими нагрузками. Для связи с системой поддержания давления используется интерфейс USB. Система также оснащена интерфейсом CAN, что позволяет соединять несколько устройств в единую сеть и обеспечить синхронное управление несколькими каналами.

Финансирование: Работа выполнена с использованием материально-технической базы ЦКП Научно-образовательного центра «Функциональные Микро/Наносистемы» МГТУ им. Н.Э. Баумана (ID 74300)

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-455-456

PRECISION AUTOMATED PRESSURE MAINTENANCE SYSTEM FOR MICROFLUIDIC LAB-ON-CHIP

V.Echeistov¹, A.Zverev¹, V.Ryzhkov², I.Ryzhikov³, V.Shakhnov², I.Rodionov¹

¹ Dukhov Automatics Research Institute, (VNIIA), Russia, 127055, Moscow, Sushevskaya Ul., 22

² Bauman Moscow State Technical University, (BMSTU), Russia, 105005, Moscow, 2-nd Baumanskaya Ul., д. 5, стр. 1

³ Institute for Theoretical and Applied Electromagnetics, Russian Academy of Sciences, (ITAE RAS), Russia, 125412, Moscow, Izhorskaya Ul., 13

The problem of controlling the flow of small volumes of liquids is a limiting factor for the operation of a microfluidic lab-on-chip in a new generation of biomedical devices. The paper presents the result of the development of a system for the precise supply of reagents to laboratory-on-chip devices used for multistage biochemical analyzes.

Key words: microfluidics, lab-on-chip, microfluidic chip, pressure maintenance system

Modern microfluidic technologies are widely used in biological and medical research, because they allow for the implementation of unique high-precision manipulations and multi-stage reactions in ultra-small volumes, up to operations with single objects. The development of microfluidic technologies has made it possible to create a laboratory on a chip - a compact device with a system of interconnected microchannels through which liquid or gas moves. The laboratory on a chip has a wide range of advantages, including reduction the consumption of reagents, minimization of size and weight relative to existing systems, low power consumption, high speed, elimination of human factor in the analysis. To use lab-on-a-chip devices, you need a high-precision flow control system that can guarantee targeted delivery of samples and reagents. The most effective flow control systems in terms of manufacturing and operation are differential pressure effect based systems that require a precise multi-channel pressure control system with a short response time. The control system must maintain pressure with an accuracy of ones of mbar, since the slightest error leads to a significant change in the speed of the sample from the design mode, which is critical in a series of analyzes in which it is necessary to ensure the delivery of the sample to the measuring device at exactly the right time. A pressure maintenance system that provides accuracy for maintaining pressure no worse than ± 1 mbar has been designed . The system consists of three main blocks: a pneumatic block containing actuators (pump, valve), an analog-digital block and a computing block that processes the signal from the analog-digital block and controls the pneumatic block. The algorithm of the computing unit provides for adaptive adjustment of the control action, which allows the use of a system for solving problems with various pneumatic loads. A USB interface is used to communicate with the pressure maintenance system. The system is also equipped with a CAN interface, which allows connecting several devices into a single network and securing the synchronous control of several channels.

Grant: The work was performed using the material and technical base of the Scientific-Educational Center "Functional Micro / Nanosystems" of the Bauman Moscow State Technical University (ID 74300)

УДК 53.082.64 ББК 35.114 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-457-458

ИНТЕГРИРОВАННЫЙ МИКРОФЛЮИДНЫЙ СЕНСОР ПОТОКА ДЛЯ ЛАБОРАТОРИЙ НА ЧИПЕ И УСТРОЙСТВ ПЕРСониФИЦИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

**Рыжков В.В.¹, Зверев А.В.^{1,2}, Андроник М.¹, Ечеистов В.В.^{1,2}, Исабаева Ж.¹,
Сорокина О.С.^{1,2}, Константинова Т.¹, Лотков Е.С.^{1,2}, Рыжиков И.А.^{1,3}, Родионов И.А.^{1,2}**

¹ МГТУ им. Н.Э. Баумана, Россия, 105005, г. Москва, 2-я Бауманская ул., д. 5, стр. 1.

² ФГУП «ВНИИА», Россия, 127055, Москва, Сушевская ул., д.22

³ ИТПЭ РАН, Россия, 125412, Москва, Ижорская ул., 13

e-mail: ryzhkov@bmstu.ru

Разработан интегрированный безмембранный сенсор для прецизионного измерения скорости потока жидкости в микроканалах лабораторий на чипе. Сенсор позволяет в реальном времени получать данные о скорости потока в канале микрофлюидного чипа и предназначен для прецизионного управления потоками жидкостей в лаборатории на чипе. Представлены результаты разработки конструкции, технологии изготовления и электронного блока управления интегрированными сенсорами потока.

Ключевые слова: Микрофлюидика, сенсор потока, лаборатория на чипе, сенсорика, персонализированная медицина.

Одной из ключевых задач создания функциональных лабораторий на чипе, способных проводить сложные многоступенчатые реакции и анализы, является прецизионный контроль подачи жидкости в отдельные части микрофлюидного чипа, например, для смешения реагентов в точных пропорциях, дозирования, фильтрации и т.п. Для решения данной проблемы неприменимы сенсоры потока, находящиеся за пределами микрофлюидного чипа, т.к. внешний сенсор и подводящие к нему трубки при подключении к чипу добавляют «мёртвый» объём, зачастую превышающий ёмкость всего чипа. Кроме того, использование внешних сенсоров потока нарушает концепцию лаборатории на чипе, где все элементы контроля должны находиться на компактном чипе. В работе представлены результаты проектирования и изготовления интегрированного безмембранного сенсора потока, а также микрофлюидного модуля высокоточного разведения жидких проб на его основе. На основании результатов численного моделирования и требований технологичности оптимизирована топология сенсора. Главной особенностью разработанного сенсора является отсутствие мембраны в конструкции, при котором удалось сохранить чувствительность и точность сенсора на уровне коммерческого мембранного аналога. С целью оптимизации конструкции сенсора в работе изготовлены и исследованы 32 сенсора с различными топологиями. Размещение сенсоров потока на чипе позволяет значительно снизить «мёртвый» объём гидродинамической системы и контролировать количество жидкости, поступающей в отдельные резервуары микрофлюидного чипа. Сенсор занимает в канале площадь 210*140 мкм² и имеет относительную погрешность 5% в диапазоне 100-1000 мкл/мин.

Исследования выполнены с использованием материально-технической базы ЦКП Научно-образовательного центра «Функциональные Микро/Наносистемы» МГТУ им. Н.Э. Баумана (ID 74300).

UDK 53.082.64 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-457-458

INTEGRATED MICROFLUIDIC FLOW SENSOR FOR LAB-ON-CHIP AND POINT-OF-CARE APPLICATIONS

**Ryzhkov V.V.¹, Zverev A.V.^{1,2}, Andronik M.¹, Echeistov V.V.^{1,2}, Issabayeva Z.¹, Sorokina O.S.^{1,2}, Konstantinova T.¹,
Lotkov E.S.^{1,2}, Ryzhikov I.A.^{1,3}, Rodionov I.A.^{1,2}**

¹ BMSTU, Russia, 105005, Moscow, 2 nd Baumanskaya Str. 5, bld. 1

² FSUE "VNIIA", Russia, 127055, Moscow, Sushchevskaya Str., 22

³ ITAE RAS, Russia, 125412, Moscow, Izhorskaya Str., 13

e-mail: ryzhkov@bmstu.ru

An integrated membrane-free sensor for precise measurements of fluid flow rate in microchannels of laboratories-on-chip has been developed. The sensor allows to measure flow on microfluidic chip in real time and is designed for liquid

samples precise dilution control on the microfluidic chip. Fabrication technology of the microfluidic chip with built-in flow sensors as well as results of experimental comparison of developed sensor with a commercial flowmeter are presented.

Key words: Microfluidics, flow sensor, lab on a chip, sensorics, point-of-care.

The task of creating a functional laboratory-on-chip capable of performing complex multistage reactions and analyses contains the problem of precise control of liquid flows into separate parts of the microanalytical chip. For example, to mix reagents in exact proportions or to concentrate antibodies in homogeneous immunological biosensors. To solve this problem, flow sensors outside the microfluidic chip are not applicable, because the external sensors and supply tubes when connected to the chip add a “dead” volume, often exceeding the capacity of the entire chip. In addition, the use of external flow sensors violates the concept of laboratory-on-chip, where all control elements must be on the same chip. Here we present results of our work on designing and fabricating of integrated membrane-free flow sensor for high precision dilution of liquid sample on microfluidic chip. Proposed sensor is intended for direct precise measurements of liquid flow rate in microchannels of laboratories-on-chip, including point-of-care devices. Based on the numerical simulation results and technological limitations the sensor topology has been optimized. The main feature of the developed sensor is the absence of a membrane in the design, along with maintaining the sensitivity and accuracy of the sensor at the level of a commercial membrane analogue. The fully biocompatible sensor is manufactured using standard microelectronics and soft lithography technologies. In order to optimize the sensor design, 32 sensors with different topologies were fabricated and studied in operation. Integration of flow sensors into the chip allows to significantly reduce the “dead” volume of the hydrodynamic system and control the amount of liquid entering the individual reservoirs of the microfluidic chip. The sensor takes an area of $210 \times 140 \mu\text{m}^2$ on the bottom of the channel and has a relative error of 5% in the range of 100-1000 $\mu\text{l}/\text{min}$.

The studies were conducted using the material and technical base of the Collective Scientific Center of the Research and Educational Center “Functional Micro / Nanosystems” of the Bauman Moscow State Technical University (ID 74300).

УДК: 615.322 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-458-461

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАЛО РАСПРОСТРАНЕННЫХ РАСТЕНИЙ СОЧИНСКОГО ПРИЧЕРНОМОРЬЯ В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СУБСТАНЦИЙ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Шмат Е.В.¹, Рыбалко А.А.¹, Рыбалко А.Е.¹, Агумава А.А.², Вышемирский О.И.²

¹ Сочинский институт (филиал) ФГАОБУ ВО Российского университета дружбы народов. 354348, Южный Федеральный округ, Краснодарский край, г. Сочи, ул. Куйбышева, 32
e-mail: sfrudn@rambler.ru

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» (ФГБНУ НИИ МП) 354376, Сочи, Адлерский з-н, с.Веселое, ул. Мира 177
e-mail: mail@primatologia.ru

С использованием сырья из растений Сочинского Причерноморья получен ряд растительных экстрактов, которые были апробированы на наличие цитостатического и цитотоксического антионкогенного потенциала. В культивируемой раковой клеточной линии SW-13 обнаружено замедление скорости деления клеток при введении полученных растительных экстрактов.

Ключевые слова: растительные экстракты, лекарственные растения, антионкогенный потенциал, раковая клеточная линия, цитостатическое действие.

Онкология является одной из основных причин смерти в мире: процент смертности от рака составляет 20%, поэтому патология занимает 2 место. Исследования показывают, что **количество** выявленных за год случаев **рака в мире за последнее** десятилетие увеличилось почти на треть. [6]. Одним из методов борьбы с онкологией является разработка и получение новых лекарственных препаратов в том числе и на основе натуральных растительных биологически активных веществ. [7].

Много растений остается до сих пор не изученными на содержании в них биологически активных веществ, обладающих антионкогенным потенциалом. В этом аспекте Сочинский анклав располагает

широким ассортиментом антропогенно значимых лекарственных растений. Предполагается использование растений Сочинского Причерноморья в качестве источников лекарственных субстанций для лечения онкологических заболеваний.

Высших сосудистых растений во флоре региона насчитывается более 2 тысяч видов с большим числом (более 20%) эндемичных и реликтовых [1]. Одним из семейств в Сочинском Причерноморье являются яснотковые или семейство мяты, они представлены 39 родами. [2]. В наших исследованиях были введены в культуру *in vitro* ряд растений рода Дубровник семейства яснотковых - *Teucrium chamaedris* L. и *Teucrium hircanicum* L. [3]. Ранее в литературе описаны виды *Teucrium* которые были исследованы на лечение различных заболеваний с положительным эффектом. [4]

После отбора в природных условиях растения выращивали в контролируемых условиях до образования семян. Далее семена проращивали и высаживали в контейнеры для отбора эксплантов. В исследованиях по использованию нодальных эксплантов при введении в культуру *in vitro* применяли агаризованную среду Мурасиге и Скуга [5] с 1 мг/л бензиламинопурина, 0,1 мг/л α -нафтилуксусной кислоты в пробирках ПБ-16. Культуры выращивали при 16 ч светового режима и температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Испытывали различные условия освещения пробирочных культур: люминесцентные лампы и светодиодные светильники (красные 70% + синие 30%). Выращиваемые под светодиодами растения были более равномерно сформированными и имели более интенсивную окраску, чем под люминесцентными лампами.

В данной работе изучались цитостатический и цитотоксический потенциалы растительных экстрактов *T. hircanicum*, на раковые клеточные линии *in vitro*. Растительные экстракты были получены из сырья методом гидроспиртовой экстракции с последующими вакуумной лиофилизацией и водной элюцией. Методика получения суперконцентрированных экстрактов следующая: к 100 гр измельченного растительного сырья, добавляли 100 мл 70% водного раствора этанола. После 72 часовой инкубации раствор центрифугировало в течении 30 мин при 3000 об/мин в 40 мл пластиковых пробирках, далее надосадочную жидкость переносили в эппендорфы (1,5 мл) и ставили в вакуумный концентратор с открытыми крышками на 12 часов при 45°C до полного испарения воды и спирта. После этого в пробирки заливали по 20 мкл деионизированной воды и ставили на 12 часов в шейкер для лучшей элюции. Надосадочная жидкость содержала суперконцентрат, который переносили в отдельные эппендорфы. После этого проводили серию титровок с коэффициентом разведения равным 2, получив 10 разведений с концентрацией от 50% до 0,1%

Титрованные растительные экстракты были апробированы на наличие цитостатического и онколитического потенциала с использованием клеточной линии SW-13, представляющей собой мелкоклеточную карциному коры надпочечника человека. При культивировании раковых клеток была обнаружена корреляция замедления скорости деления с процентом введения полученных нами растительных экстрактов в культуральную среду DMEM.

В связи с этим, считаем целесообразным расширение исследований по поиску эффективных источников лечебных субстанций на основании местной растительной флоры, а также эффективных приемов их массового производства и применения.

Литература

1. Солодько А.С., Нагалецкий М.В., Кирий П.В. Атлас флоры Сочинского Причерноморья. Дикорастущие сосудистые растения. Сочи, 2006, 287 с.
2. Рыбалко А.А., Рыбалко А.Е. Разработка широкомасштабного метода микроразмножения представителей флоры Сочинского Причерноморья. V Всероссийская научно-практическая конференция «Устойчивое развитие особо охраняемых природных территорий». Сочи 10-12 октября 2018 с. 296-301.
3. Mulas M. Traditional Uses of LABIATAE in the mediterranean area. Workshop Products from Labiatae an overview: uses, trade and quality. International Symposium The Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilization 22-25 February 2006 - Sanremo, Italy. 4.
5. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture. *Physiologia plantarum*, 1962, 15, N 4, p. 473-474
6. The Global Cancer Observatory. All cancers Source: Globocan 2018. – 2018.
7. Патент РФ RU2246963C1 2005.02.27 Бизиков А.А. (RU) ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ РАСТИТЕЛЬНЫЙ СБОР ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-458-461

PROSPECTS FOR USAGE THE RARE PLANTS OF THE SOCHI BLACK SEA REGION AS THE SOURCES OF MEDICINAL SUBSTANCES FOR THE TREATMENT OF ONCOLOGICAL DISEASES

Shmat E.V.¹, Rybalko A.A.¹, Rybalko A.E.¹, Agumava A.A.², Vichemirsky O.I.²

¹ Sochi Institute (branch) FSAEI HE Russian Peoples' Friendship University, 354348, Southern Federal District, Krasnodar Region, Sochi, st. Kuybysheva, 32
e-mail: sfrudn@rambler.ru

² Federal State Budget Scientific Institution "Research Institute of Medical Primatology" (FSBSI RI MP) 354376, Sochi, Adler district, s. Veseloe, st. World 177
e-mail: mail@primatologia.ru

Using raw materials from plants, a number of plant extracts can be obtained that have been tested for the presence of cytostatic and cytotoxic anti-oncogenic potential. In cultured cancer cell lines, SW-13 shown a slowdown in cell division rate when plant extracts are added.

Key words: plant extracts, medicinal plants, anti-oncogenic potential, cancer cell line, cytostatic effect.

Oncology is one of the leading causes of death in the world: the cancer mortality rate is 20%, so pathology takes 2nd place. Studies show that the number of cases in the world over the past decade has increased by almost a third. [6]. One of the methods to combat it is the development and production of new drugs based on natural plant-based biologically active substances. [7].

Many plants are still not studied on the content of biologically active substances with anti-oncogenic potential. In this aspect, the Sochi enclave has a wide range of anthropologically significant medicinal plants. It is planned to use the Sochi Black Sea plants as sources of medicinal substances for the treatment of cancer.

In the region's flora, there are more than 2 thousand species of higher vascular plants with a large number (more than 20%) of endemic and relict ones [1]. One of the families in the Sochi Black Sea Coast are the Lamiaceae or the mint family, they are represented by 39 genera. [2]. In our studies, a number of plants of the genus *Dubrovnik* of the Laminata family, *Teucrium chamaedris* L. and *Teucrium hyrcanicum* L., were introduced into the in vitro culture [3]. Earlier in the literature, *Teucrium* species were described that have been investigated for the treatment of various diseases with a positive effect.

After selection under natural conditions, the plants were grown under controlled conditions until seed formation. Next, the seeds were germinated and planted in containers for selection of explants. In studies on the use of nodal explants when introduced into an in vitro culture, Murasige and Skoog [5] agar medium was used with 1 mg / L benzylaminopurine and 0.1 mg / L α -naphthylacetic acid in PB-16 tubes. The cultures were grown at 16 h of light and a temperature of 24 ± 1 °C. We tested various lighting conditions for test cultures: fluorescent lamps and LED lamps (red 70% + blue 30%). Plants grown under LEDs were more uniformly formed and had a more intense color than under fluorescent lamps.

In this work, we studied the cytostatic and cytotoxic potentials of plant extracts of *Teucrium hyrcanicum* on invitro cancer cell lines. Plant extracts were obtained from raw materials by hydro alcohol extraction followed by vacuum lyophilization and water elution. The procedure for obtaining superconcentrated extracts is as follows: to 100 g of crushed plant material, 100 ml of a 70% aqueous solution of ethanol was added. After 72 hours of incubation, the solution was centrifuged for 30 min at 3000 rpm in 40 ml plastic tubes, then the supernatant was transferred to eppendorfs (1.5 ml) and placed in a vacuum concentrator with open covers for 12 hours at 45 °C until the water evaporated completely and alcohol. After that, 20 μ l of deionized water were poured into test tubes and placed in a shaker for 12 hours for better elution. The supernatant contained superconcentrate, which was transferred to separate eppendorfs. After that, a series of titrations was carried out with a dilution coefficient of 2, having obtained 10 dilutions with a concentration of from 50% to 0.1%

Titrated plant extracts were tested for the presence of cytostatic and oncolytic potential using the SW-13 cell line, which is a small cell carcinoma of the human adrenal cortex. During the cultivation of cancer cells, a slowdown in the rate of division was found to correlate with the percentage of plant extracts obtained by us in the DMEM culture medium.

In this regard, we consider it expedient to expand research on the search for effective sources of medicinal substances based on local plant flora, as well as effective methods for their mass production and use.

References

1. Solodko A.S., Nagalevsky M.V., Kiriya P.V. Atlas of flora of Sochi Black Sea coast. Wild vascular plants. Sochi, 2006, p. 287
2. Rybalko A.A., Rybalko A.E. Development of a large-scale method of micropropagation of representatives of the flora of the Sochi Black Sea region. V All-Russian Scientific and Practical Conference „Sustainable Development of Protected Areas“. Sochi October 10-12, 2018 p. 296-301
3. Mulas M. Traditional Uses of LABIATAE in the mediterranean area. Workshop Products from Labiatae an overview: uses, trade and quality. International Symposium The Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilization February 22-25, 2006 - Sanremo, Italy. 4
5. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture. *Physiologia plantarum*, 1962, 15, N 4, p. 473-474
6. The Global Cancer Observatory. All cancers Source: Globocan 2018. - 2018.
7. RF patent RU2246963C1 2005.02.27 Bizikov A.A. (RU) ONCOLOGICAL HERB COLLECTING FOR TREATING CANCER

ISBN 978-5-6045396-0-6



9 785604 539606